



MASTERARBEIT

Frau
Anne-Marie Pflugbeil

Etablierung mitochondrialer SNPs in der molekulargenetischen Forensik

2012

MASTERARBEIT

Etablierung mitochondrialer SNPs in der molekulargenetischen Forensik

Autorin:

Anne-Marie Pflugbeil

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO10w1-M

Erstprüfer:

OA Dr. med. K. Thiele

Zweitprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. D. Labudde

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Denn ohne das Zusammenwirken aller Personen wäre diese Arbeit wahrscheinlich nicht zustande gekommen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt in erster Linie meinen Betreuern OA Dr. med. K. Thiele und Prof. Dr. D. Labudde. Des Weiteren möchte ich dem Team der Abteilung für molekulargenetische Forensik der Rechtsmedizin Leipzig, Prosektur Chemnitz für die Unterstützung danken. Ein herzlicher Dank geht an Herrn M. Kohl und Frau M. Nastainczyk-Wulf für die methodische Einarbeitung. Für die Vorbereitung der Knochen und Zähne, die Erstellung der Präparationsfotos sowie für ein tatkräftiges und herzliches Entgegenkommen, möchte ich mich bei Frau S. Schulz bedanken. Ebenfalls möchte ich einen großen Dank gegenüber Frau M. Harthun für die stets angenehme Zusammenarbeit und die zahlreichen konstruktiven Ideen, aussprechen. Zudem möchte ich mich beim Zentrum für Histopathologie Chemnitz und hier insbesondere bei Priv.-Doz. Dr. med. habil. J. O. Habeck für die Bereitstellung eines Isolationsplatzes bedanken. Aber auch für die Motivation immer das Beste zu hoffen und deine stetige Unterstützung, auf die ich nicht nur in dieser Situation zählen konnte.

Ein ganz herzlicher Dank geht nach Österreich, an die Gerichtliche Medizin der Medizinischen Universität Innsbruck. Genauer an Herrn Prof. Dr. W. Parson, Leiter der Abteilung Forensische Molekularbiologie und insbesondere an Herrn M.Sc. H. Niederstätter, für die Bereitstellung benötigter Chemikalien für das qrt-PCR-Assay und die problemlose und hervorragende Kommunikation, speziell bei der Beantwortung methodengebundener Fragen. Herrn Dr. rer. nat. H. Bruchhaus, aus der Arbeitsgruppe Anthropologie des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena, möchte ich für Anregungen im Hinblick auf die Bedeutung des Knochenfeinbaues auf DNA-Ausbeuten, danken.

Meinen Eltern und all meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

„Es ist schon lange einer meiner Grundsätze, dass die kleinsten Dinge bei weitem die wichtigsten sind“

Holmes, eine Frage der Identität

Bibliografische Angaben

Pflugbeil, Anne-Marie: Etablierung mitochondrialer SNPs in der molekulargenetischen Forensik, 97 Seiten, 25 Abbildungen, Hochschule Mittweida (FH), Fakultät MNI

Masterarbeit, 2012

Referat

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines methodischen Vorgehens für die Analyse ausgewählter *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) des mitochondrialen Genoms. Dabei sollen benötigte Schritte von der Isolation der mtDNA aus dem Untersuchungsmaterial bis zur Analyse ausgewählter mtSNPs geprüft werden. Der methodische Ablauf wurde an problematischem Untersuchungsmaterial erprobt. Die Ergebnisse der Forschungsarbeit werden in einem ausführlichen Arbeitsprotokoll zusammengefasst. Dieses kann für thematisch ähnliche Fragestellungen in der molekulargenetischen Forensik zur Verfügung gestellt werden.

Englischer Titel

Establishment of mitochondrial SNPs in forensic molecular genetics.

Abstract

The aim of this thesis is to establish mtSNP analysis in forensic science to obtain an alternative for the analysis of highly degraded test material with common STR-Systems. After literature research, 24 relevant mtSNPs were selected, located in the coding and noncoding region of mtDNA. In addition to mitochondrial division, mtSNPs were displayed in different multiplex assays, to increase the discrimination power of several mtSNP sets. Nuclear and mitochondrial DNA was obtained from approx. 60 year floor-mounted skeletal remains and, if present, teeth by phenol-chloroform extraction. The principle of minisequencing was subsequently used to examine the previously selected mtSNPs. *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) are pointmutations, located in the mitochondrial genome. They represent a single, evolutionary event in the human history. The increasing use of mitochondrial DNA (mtDNA) in forensic science is based on several well recognized advantages in comparison to nuclear DNA testing in cases of extreme sample degradation, shed hairs, or where comparisons between maternal relatives are necessary.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Vorwort	V
1 Einleitung	1
1.1 Mitochondriale DNA	1
1.1.1 Besonderheiten und Struktur	1
1.1.2 Vererbung und Genetik	3
1.1.3 Bedeutung der Phylogenie	4
1.2 Mitochondriale DNA als molekularer Marker	7
1.3 Unterteilung der mitochondrialen Haplogruppe H mit Hilfe mitochondrialer SNPs ...	8
1.4 Aufbau des Knochengewebes	10
1.5 DNA Degradation in Knochen- und Zahngewebe	11
1.6 <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs) im mitochondrialen und genomischen Kontext	13
1.7 Analysemethoden für SNPs	15
1.7.1 Minisequenzierung (<i>Einzelbasenverlängerung</i>)	15
1.8 Detektionsverfahren für SNPs	18
1.8.1 Kapillarelektrophorese	18
1.9 Ausgewählte mtSNP-Systeme für die Etablierung	19
2 Zielstellung	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Geräte und Software	27
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3 Chemikalien und Verbrauchslösungen	30
3.1.4 Benötigte Oligonukleotide	33

3.1.4.1	Multiplex-PCR-Primer	33
3.1.4.2	SNaPshot-PCR-Primer	35
3.1.5	Biologisches Untersuchungsmaterial	37
3.1.5.1	Fundort und Beurteilung des Untersuchungsmaterials	39
3.2	Methoden	41
3.2.1	Probenpräparation und mechanische Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials ...	41
3.2.2	DNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform	42
3.2.3	DNA-Quantifizierung.....	44
3.2.3.1	gDNA-Quantifizierung mittels qrt-PCR	45
3.2.3.2	mtDNA-Quantifizierung mittels qrt-PCR	46
3.2.4	Überprüfung der Reinheit der DNA-Isolate	47
3.2.5	mtSNP-Analyse	49
3.2.5.1	Multiplex-PCR ausgewählter mtSNPs	51
3.2.5.2	Enzymatische Aufreinigung	52
3.2.5.3	Minisequenzierung mittels SNaPshot-PCR	52
3.2.5.4	Detektion mitochondrialer SNPs mittels Kapillarelektrophorese	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Erzielte gesamtDNA-Ausbeuten mittels Phenol-Chloroform Isolation.....	55
4.2	Etablierung des qrt-Pcr-Assays für eine mtDNA-Quantifizierung	55
4.3	Kontaminationsgrad der DNA-Isolate	58
4.4	Einfluss des Knochenfeinbaus auf die gDNA- und mtDNA-Ausbeute.....	59
4.5	Etablierung der mtSNP-Analyse in der molekulargenetischen Forensik	62
4.5.1	Vorversuche und Optimierung	62
4.5.1.1	Einstellung der Oligonukleotidkonzentrationen.....	62
4.5.1.2	Testung der Analyse-Primer im Singleplex und Multiplexverfahren	65
4.5.1.3	Fragmentlängenanalyse	69
4.5.2	Etablierung der mtSNP-Analyse aus lang gelagertem Knochenmaterial	70
4.5.2.1	Analyse von Mischprofilen und Heteroplasmie	76
4.5.3	Etablierung der mtSNP-Analyse aus lang gelagertem Zahnmaterial	76
5	Diskussion	79
5.1	Phenol-Chloroformextraktion der DNA	79

5.2	Etablierung des mtDNA-qrt-PCR-Assays.....	80
5.3	Kontaminationsgrad der DNA-Isolate	80
5.4	Gegenüberstellung der gDNA- und mtDNA-Ausbeute aus dem Untersuchungsmaterial	81
5.5	Etablierung mitochondrialer SNPs in der molekulargenetischen Forensik.....	82
5.5.1	Vorversuche	82
5.5.2	Etablierung der mtSNP-Analyse aus lang gelagertem Knochen- und Zahnmaterial .	85
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	89
	Literaturverzeichnis	91

II. Abbildungsverzeichnis

1.1	mtDNA Genom	2
1.2	Maternalen Vererbungsgang der mtDNA	4
1.3	Topologie mitochondrialer Haplogruppen (mod. nach [vK09]).....	6
1.4	Unterteilung der mitochondrialen Makrohaplogruppe H.	9
1.5	Histologische Struktur eines Knochens.....	11
1.6	Ablauf Minisequenzierung (SNaPshot-Methodik).	17
1.7	Schema einer Kapillarelektrophoreseeinheit.	19
3.1	Skelettmaterial Fund 1.....	39
3.2	Vorbereitung der Knochenfragmente für eine anschließende Aufarbeitung.....	42
3.3	Ablauf des Allel-spezifischen-Primerextension-Assays.	50
4.1	Bestimmung der Regressionsfunktion.	56
4.2	STR-Profil (<i>Tibia</i> , Fund 3).	58
4.3	STR-Profil degradierter DNA (<i>Cranium</i> , (Fund 1)).	59
4.4	Gegenüberstellung des Knochenfeinbaus von (<i>Cranium</i> , (Fund 4)) und <i>Humerus</i> (Fund 1).	60
4.5	Vergleich d. Multiplexanalyse (System 2) unter Einbeziehung der Ergebnisse aus dem qrt-PCR-mtDNA-Assay.....	65
4.6	Singleplexanalyse System 2.	66
4.7	Singleplexanalyse System 3.	67
4.8	Multiplexamplifikation System 1 bis System 3.....	71
4.9	Multiplexamplifikation System 1 bis System 3.....	72
4.10	Multiplexamplifikation System 2.	73
4.11	Multiplexamplifikation System 3.	74
4.12	Ergebnis einer Multiplexamplifikation der drei Systeme unter der Annahme einer De- gradation der mtDNA.	75
4.13	Analyse von Mischprofilen mit Hilfe der 8-plex-Systeme	76
4.14	Testung der drei Systeme am Zahnmaterial.....	77
5.1	Vergleich der Stärke der Substantia compacta der Knochenregionen.	82

III. Tabellenverzeichnis

1.1	Ausgewähltes mtSNP-Set.	23
3.1	Verwendete Multiplex-PCR-Primer.	34
3.2	Verwendete SNaPshot-PCR-Primer.	36
3.3	Biologisches Untersuchungsmaterial.	38
3.4	Reaktionsansatz für die Quantifizierung von gDNA.	46
3.5	Primersequenzen und Sonden für das mitochondriale qrt-PCR-Assay.	47
3.6	qrtPCR-Reaktionsatz für die Simultanquantifizierung von mtDNA und gDNA (143 bp-Ansatz).....	48
3.7	Reaktionsansatz für die Amplifikation der PowerPlex® S5-Marker.....	48
3.8	Amplifikationsbedingungen S5.....	49
3.9	Multiplex-PCR-Reaktionsansatz.	51
3.10	Amplifikationsbedingungen Multiplex-PCR.....	52
3.11	Fluoreszenzmarkierung eingesetzter ddNTPs.	53
3.12	SNaPshot-PCR-Reaktionsansatz.....	53
3.13	Amplifikationsbedingungen SNaPshot-PCR.....	53
3.14	Probenvorbereitung ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.	54
3.15	Umgebungsbedingungen für den Lauf.....	54
4.1	Gegenüberstellung der Quantifizierungsergebnisse und der Ausprägung der <i>Substantia compacta</i> von Fund 1 und Fund 2.	61
4.2	Eingesetzte SNaPshot-Primer Konzentrationen.....	63
4.3	Fragmentlängenanalyse.	70

IV. Abkürzungsverzeichnis

aDNA	alte DNA, Seite 13
AFDIL	Armed Forces DNA Identification Laboratory, Seite 33
Aqua dest	destilliertes Wasser, Seite 32
bp	Basenpaare, Seite 33
Ca-Ionen	Calciumionen, Seite 44
Ct	Cycle threshold, Seite 57
dNTPs	desoxynukleosidtriphosphat, Seite 49
dsDNA	doppelsträngige DNA, Seite 56
DTT	Dithiothreitol, Seite 44
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Seite 32
EXO I	Exonuclease I, Seite 32
gDNA	genomische DNA, Seite 45
HVS	Hyper variable segment, Seite 15
IPC	Amplifikation internal Positive Control, Seite 46
KE	Kapillarelektrophorese, Seite 19
mer	Oligomer, Seite 85
MGB	Minor Groove Binder, Seite 46
mtDNA	mitochondriale DNA, Seite 15
mtGE	genomisches Äquivalent, mtDNA-Kopienzahl, Seite 56
nts	Nucleotides, Seite 68
PCR	Polymerase chain reaction, Seite 32
qrt-PCR	quantitative real time PCR, Seite 45
RB1	Retinoblastoma 1, Seite 47
rCRS	revised Cambridge Reference Sequence, Seite 15
RFU	Relative Fluorescence Units, Seite 72
rpm	round per minute, Seite 44
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase, Seite 32
SBE	Single base extension, Seite 49
SNPs	Single nucleotide polymorphisms, Seite 15
STR	Short tandem repeats, Seite 15
tRNA	transfer RNA, Seite 47

V. Vorwort

Das Fachgebiet der Forensik wird speziell durch die Weiterentwicklung und Etablierung effektiver molekulargenetischer Untersuchungen geprägt. Neben der Analyse des „genetischen Fingerabdrucks“ stellt die Analyse mitochondrialer DNA (mtDNA) eine technologische Nische dar, welche insbesondere bei der Zuordnung von qualitativ und quantitativ geringen Spuren in der Spurenkunde wertvolle Hinweise liefern kann. Infolge von postmortalen Prozessen wird die DNA degradiert. Die Wahl geeigneter DNA-Isolations- sowie Analysemethoden für schwer zu typisierendes biologisches Spurenmaterial, stellt oftmals eine Herausforderung in der Forensik dar. Gerade bei der Untersuchung von skelettierten Leichen und Skelettteilen bleibt die Untersuchung der mtDNA das Mittel der Wahl. Trotz der einer hohen biostatistischen Aussagekraft von STR-Analysen, weist mtDNA methodische Stärken auf, welche die Möglichkeiten einer Zellkern-DNA-Analyse übertreffen. In diesem Zusammenhang wird derzeit an der Etablierung einer neuen Systemgeneration - der sogenannten *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) - gearbeitet. Dafür stehen verschiedene Analyseansätze zur Verfügung. Eine in molekulargenetischen Analyselaboren verbreitete Methode ist die Minisequenzierung, bei der SNPs durch Amplifikation, Aufreinigung der DNA, der Einzelbasenverlängerung und der abschließenden Analyse auf Fluoreszenzdetektion-basierten Geräten, analysiert werden. Derzeit existieren im forensischen Bereich nur wenige mtSNP-Systeme für die Identifikation von unbekannten Personen oder Leichen bzw. für die Zuordnung von Spuren zum Spurenverursacher. Die Gefahr von Kontaminationen während der mtDNA-Extraktion sowie das Vorhandensein von mtDNA-Mischformen erschweren eine erfolgreiche Etablierung der mtDNA-Analyse für die Spurenfallarbeit [SLC01].

1 Einleitung

1.1 Mitochondriale DNA

1.1.1 Besonderheiten und Struktur

Neben der Kern-DNA findet sich beim Menschen zusätzlich extrachromosomale DNA in Form von mitochondrialer DNA, welche sich in der Struktur und Genetik deutlich von der Kern-DNA abgrenzt. Im Vergleich zur nukleären DNA weist mtDNA eine weitaus höheren Mutationsrate auf. Diese kann in einigen Abschnitten des Biomoleküls eine fünf bis zehnfach höhere Rate erreichen, was wiederum zu einem hohen Grad an Sequenzvariabilität führt und mtDNA vor allem bei forensischen Fragestellungen interessant macht. Die Mutationsgeschwindigkeit der mtDNA liegt mit einer Rate von $0,017 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Position pro Jahr für das gesamte mitochondriale Genom ohne Kontrollregion weitaus höher als die von nukleären Genen [PMS⁺97]. Für die hypervariablen Regionen (HVSI und HVSII) der Kontrollregion ist diese Geschwindigkeit noch höher. Die Anzahl an mtDNA-Molekülen in einer Zelle variiert zwischen 100 und 1000 Molekülen. Da jede Zelle mehrere hundert Mitochondrien besitzt, können mehrere tausend mtDNA Moleküle in einer einzelnen Zelle vorliegen. Diese hohe Kopienzahl begründet die hohe Erfolgsquote bei Untersuchungen degradierter, biologischer Proben [But11]. Als doppelsträngiges Ringmolekül mit einer Größe von 16569 bp, stellt das humane mitochondriale Genom ein kompaktes Untersuchungsobjekt dar (Abbildung 1.1). Im nativen Zustand liegt das Ringmolekül in einer negativ gewundenen „supercoil“-Konformation vor. Die beiden Stränge wurden nach ihrer Nukleotidzusammensetzung in einen H- („heavy“) und L- Strang („light“) unterschieden. Eine Unterscheidung dieser Form basiert auf der unterschiedlichen Dichte der beiden Einzelstränge in der denaturierenden CsCl-Dichte-zentrifugation [Sch99]. Anders als der L-Strang besteht der H-Strang aus einer größeren Anzahl an Guanin-Nukleotiden, welche die höchste relative molekulare Masse der vier Nukleotide besitzen. Im Vergleich zum Kerngenom unterscheidet sich der GC-Gehalt der mtDNA nicht wesentlich von dem der nukleären DNA. Der Großteil des mitochondrialen Genoms kodiert für insgesamt 37 Gene, darunter Gene für zwei ribosomale RNAs (12S- und 16S-rRNA), für 22 Transfer-RNAs (tRNAs) und 13 proteinkodierende Gene (577-16023). Ein 1100 bp langer Abschnitt zwischen den Genen für die tRNA^{Pro} und die tRNA^{Phe}, der die Promotoren und den Replikationsursprung für den H-Strang enthält, ist der einzige größere Sequenzanteil der mtDNA, der keine kodierende Funktion hat [GR07]. Dieser Bereich wird als Kontrollregion der mtDNA bezeichnet (16024-576). Innerhalb dieser Region sind drei besonders polymorphe Regionen lokalisiert, bekannt als „Hypervariable Regionen“ (HVSI, HVSII, HVSIII) (Abbildung 1.1). Neben der kodierenden Region der mtDNA fallen insbesondere diese polymorphen Regionen in den Fokus forensischer Analysen. Der Konvention entsprechend, dass beim

Die Nummerierung von Nukleotidpositionen basiert auf einer willkürlichen Festlegung. So wurde die Nukleotidposition eins einer *MboI* Restriktionsenzymstichstelle innerhalb der Kontrollregion zugeteilt. Somit ist, anders als oft angenommen, die Position eins nicht der Replikationsursprung [ABBB81]. Nachdem in den späten 1960er Jahren die Funktion und der Aufbau der mtDNA geklärt wurde, konnte erst zwölf Jahre später die vollständige menschliche mitochondriale Sequenz erstellt werden (Anderson Sequenz). Weitere 18 Jahre später wurde diese Sequenz um elf Sequenzierungsfehler korrigiert [ABB⁺81]. Diese Sequenz wird als revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) bezeichnet und dient seither als Referenz für vergleichende Sequenzanalysen. Bei Differenzierungsanalysen werden lediglich die Abweichungen zur Referenzsequenz als Mutationen berichtet. Die im Jahre 1981 ermittelte mtDNA-Sequenz stammte primär von einem Individuum mit europäischer Herkunft. Sequenzierungslücken, entstanden durch veraltete Sequenzierungstechniken, wurden z.B. durch HeLa-Sequenzabschnitte ersetzt. Mit Hilfe neuer Sequenzierungstechniken der letzten beiden Jahrzehnte konnten die Sequenzfehler beseitigt werden, wodurch die Sequenz für zukünftige Analysen robuster wurde. Einer der Fehler, der im Jahre 1981 ermittelten Anderson Sequenz, war das Fehlen eines Cytosins an Position 3107, welche später bei Sequenzkorrekturen als Nukleotiddeletion gekennzeichnet wurde, um die ursprüngliche Nukleotidanzahl von 16569 bp beizubehalten. Die folgenden sieben Positionen waren exakt, wiesen jedoch einen geringen Polymorphiegrad auf: 263A, 311-315CCCCC, 750A, 1438A, 4769A, 8860A, and 15326A. Deutlich wurde, dass keine sequenziellen Fehler innerhalb der Kontrollregion vermerkt wurden [AKC⁺99].

1.1.2 Vererbung und Genetik

Nach bisherigem Wissensstand erfolgt eine Weitergabe von mtDNA hauptsächlich durch die Mutter (Abbildung 1.2). Somit sind mitochondriale Genome entlang einer Vererbungslinie grundsätzlich als identisch zu betrachten. Bisher ist nur ein Fall bekannt, bei dem eine paternale Transmission nachweisbar war [SV02]. Begünstigt wird die maternale Vererbung durch das große Plasmavolumen einer Eizelle und einer weitaus höheren Anzahl darin enthaltener Mitochondrien (ca. 100.000) gegenüber der Spermazelle (etwa 100). Ebenfalls unterdrücken physikalische Barrieren das Eindringen und den Verbleib paternalen Mitochondrien [GR07].

Das Phänomen der Koexistenz von mtDNA Molekülen innerhalb einer Zelle, eines Gewebes oder zwischen Individuen wird als Heteroplasmie beschrieben und wird durch Nukleotidsubstitutionen mutierter DNA Moleküle verursacht. In diesem Zusammenhang spielt auch der Vererbungsvorgang der mtDNA eine Rolle, bei dem mtDNA-Genome eher zufällig auf die Nachkommenschaften verteilt werden [HP99, Par09]. Eine ebensolche Heteroplasmie führt zu einem gemischterbigen Genotyp. Reguliert wird der Mechanismus durch einen sogenannten „Bottleneck“-Effekt, bei dem nur ein geringer Anteil an heteroplastischen mtDNA-Typen von der Mutter an die Kinder weitergegeben werden.

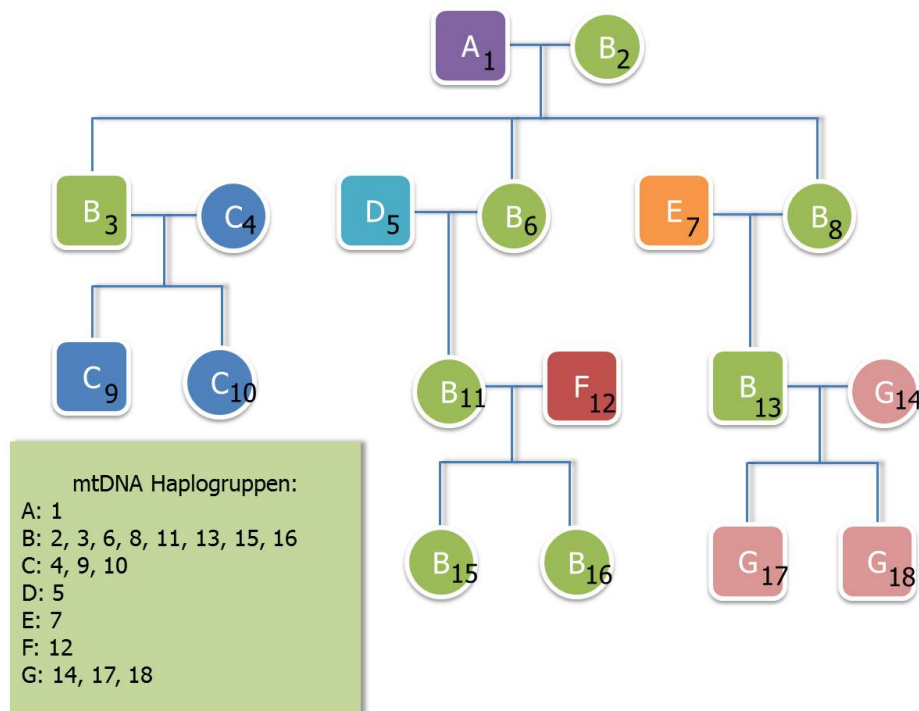


Abbildung 1.2: **Maternaler Vererbungsgang der mtDNA (mod. nach [But11]).**

Abgebildet ist ein hypothetischer Stammbaum für 18 Individuen. Verdeutlicht wird der maternale Vererbungsgang der mtDNA in den Nachkommenschaften. Die Rechtecke stellen männliche - und die Kreise weibliche Nachkommen dar. Jeder mtDNA-Typ wird durch einen der Buchstaben beschrieben. Unterschiedliche mtDNA Typen werden bestimmten mitochondrialen Haplogruppen zugeteilt, bedingt durch sequenzielle Unterschiede. Die Nachkommen mit derselben mtDNA werden somit auch derselben mitochondrialen Haplogruppe zugeordnet. Die Individuen sind in dieser Illustration von eins bis 18 nummeriert. Eine Zuordnung der Individuen in mitochondriale Haplogruppen ist grün hinterlegt, wobei die Großbuchstaben wahllos gewählt wurden und keiner existierenden mitochondrialen Haplogruppe in diesem Beispiel entsprechen.

Es wird vermutet, dass mitochondriale Genome in der Vererbungslinie eher nach einem homoplasmatischen Zustand streben. Das Heteroplasmie-Level unterscheidet sich je nach Zelltyp und Gewebeart, wobei eine Beurteilung des Grades an Heteroplasmie von der Analysemethoden abhängt [HFR⁺95]. Im Rahmen von Analysen, bei denen mtDNA als molekularer Marker dient, können heteroplasmische Nukleotidpositionen für die Beurteilung des Grades an Individualität einer biologischen Spur hilfreich sein. Neben der Weitergabe der mtDNA von einer Generation zur nächsten spielt der „Bottleneck“-Effekt bei der Evolution der mtDNA eine große Rolle. Werden die Mutationsraten des nukleären Genoms und des mtGenoms gegenübergestellt, so wird deutlich, dass die mtDNA weitaus rascher evolviert als das Kerngenom. Diese Feststellung wird durch die höhere Mutationsrate begründet, welche durch ein Fehlen von effizienten Reperaturmechanismen und durch die Exposition der mtDNA mit mutagenen Sauerstoffderivaten, begünstigt wird. Allerdings kann sich eine Mutation bei Betrachtung einer ausreichend großen Ausgangspopulation nur schwer etablieren. D.h diese Mutation wird sich lediglich über

sehr lange Zeiträume durchsetzen können. Im Gegensatz dazu wird sich die Mutation bei einer kleineren Ausgangspopulation sehr schnell akkumulieren, bedingt durch den genetischen Drift. Die mitochondriale Vererbung wird in den meisten Fällen als rein asexueller Prozess betrachtet bei dem eine ausschließlich klonale Weitergabe der mtDNA erfolgt. Über längere Zeiträume kommt es in solchen rein klonalen Erblinien jedoch zur Anreicherung nachteiliger Mutationen. Dieser Degenerationsprozess wird als „Muller’s ratchet“ (nach Hermann Muller begründet) bezeichnet [Mul64]. Faktoren wie die geringe Größe oder auch der „Bottleneck“-Effekt scheinen diesem Phänomen jedoch entgegen zu wirken.

1.1.3 Bedeutung der Phylogenie

Zwei wesentliche Eigenschaften machen die mitochondriale DNA für evolutionäre und populationsgenetische Studien interessant. Zum einen die hohe Variabilität der mtDNA und zum anderen die Vererbung entlang der mütterlichen Ebene. Mutationen haben sich im Laufe der Zeit und infolge des „Bottleneck“-Effektes angereichert und Spuren hinterlassen, welche mit subkontinentalen Grenzen spezifische Muster bilden [Par09]. Sowohl die Sequenzvariabilität, als auch der Vererbungsmodus der mtDNA machen es möglich mitochondriale Sequenzen aufgrund gemeinsamer Mutationen in mitochondriale Haplotypen einzuteilen. Haplotypen, welche dieselben Sequenzmotive aufweisen werden zu Haplogruppen zugeordnet [SBMR07]. Aus phylogeografischer Sicht sind diese mtDNA Haplogruppen mit geografischen Grenzen in Einklang zu bringen. Mit der erstmaligen Nutzung PCR-basierter Methoden in den frühen 90er Jahren wurde es möglich, hypervariable Regionen der mtDNA verbunden mit einem geringerem Zeitaufwand, zu analysieren und im Hinblick auf die Erhebung von Populationsdaten zu untersuchen [SBMR07]. Die hohe Mutationsrate in diesen nichtkodierenden Abschnitten der mtDNA machten diese für populationsgenetische Untersuchungen besonders interessant. Mittlerweile werden jedoch in die Definition mitochondrialer Haplogruppen Mutationen aus dem kodierenden Bereich mit einbezogen. Das forensische Interesse an der mitochondrialen Phylogenie besteht in der groben geographischen Zuordenbarkeit einer mtDNA-Haplogruppe und der damit einhergehenden Auswahl von relevanten Datenbankstichproben zur Abschätzung von Frequenzwerten. Neben Bäumen können auch Netzwerke für die Darstellung von Beziehungen zwischen einzelnen Haplogruppen verwendet werden. Mit diesen Netzwerken werden Verwandtschaftsbeziehungen präziser und eine nachträgliche Einteilung zu den einzelnen Haplogruppen wird erleichtert [BMR00]. Mit den so gewonnenen Häufigkeiten von Haplogruppen ist es möglich, Diversitäten innerhalb der betrachteten Populationen und zwischen jeweils zwei verschiedenen Populationen zu berechnen. Die Relation dieser beiden Diversitäten ergibt ein Maß für den effektiven Abstand zweier Populationen voneinander [BMR00]. Anhand der so gewonnenen Abstände hoffen viele Evolutionsforscher die Herkunft des Menschen aus Afrika weiter belegen zu können, da besonders in dieser Region das höchste Level an mtDNA-Diversität gefunden wurde. Diese Haplotypen wurden den äl-

testen Haplogruppen L0 - L7 zugeteilt (Abbildung 1.3). Die Haplogruppe L3 präsentiert zugleich aus phylogeografischer Sicht die europäische Diversität und wird in die zwei eurasischen Superhaplogruppen M und N unterteilt (Abbildung 1.3). Die Makrohaplogruppen divergierten in weitere Subcluster, welche die eurasischen und europäischen Haplogruppen bildeten [SBMR07].

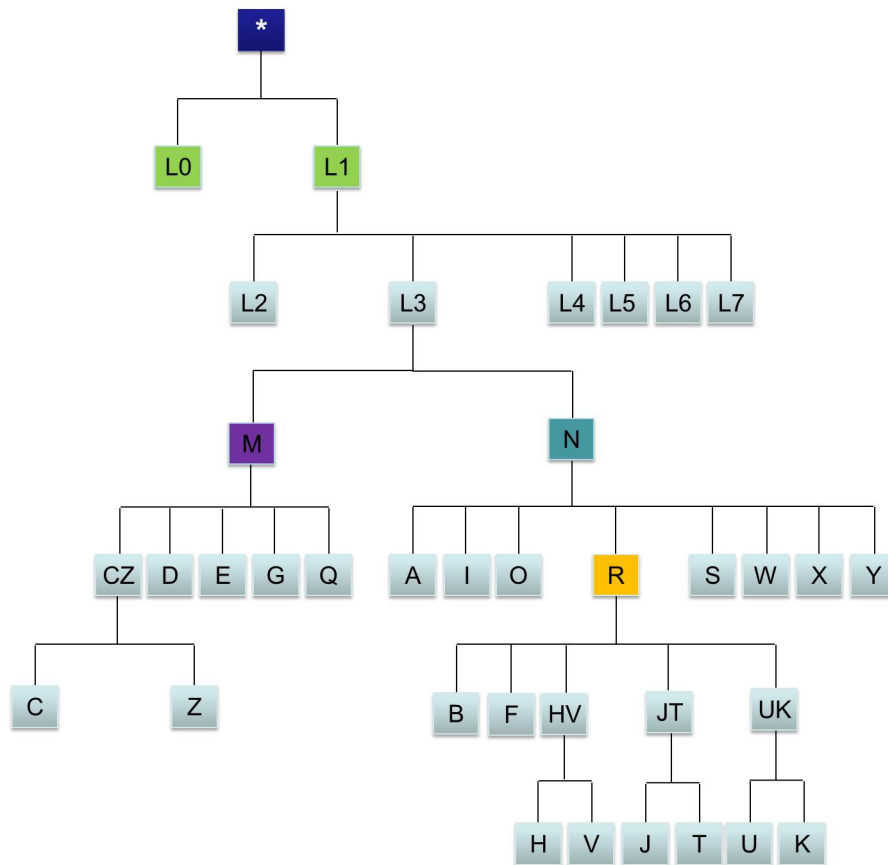


Abbildung 1.3: **Topologie mitochondrialer Haplogruppen (mod. nach [vK09]).**

Vereinfachte Darstellung der Unterteilung in mitochondrialer Haplogruppen. Die Haplogruppen sind mit alphabetischen Großbuchstaben gekennzeichnet. Die Wurzel des Baumes ist mit einem Stern (*) markiert und repräsentiert die „Urmutter“ der mtDNA aller Menschen, auf sequenzieller Ebene. Die im Baum tiefste Haplogruppe, ist die Haplogruppe L, welche den afrikanischen Ursprung beschreibt. Haplogruppe L3 unterteilt sich in die Makrohaplogruppen M, N und R, welche Sequenzvariationen außerhalb von Afrika einbeziehen. Haplogruppen, die mit einem Stern markiert sind, werden in sich in weitere Untergruppen eingeteilt. Es sei erwähnt, dass dieser Baum in dem Sinne keine globale Zusammenfassung der mtDNA-Variation darstellen soll. Eher dient dieser zum Nachvollziehen der Topology von mtDNA-Haplogruppen.

1.2 Mitochondriale DNA als molekularer Marker

Eine Untersuchung von mtDNA in der forensischen Molekulargenetik findet gerade dann statt, wenn die Analyse biologischer Spuren mit den herkömmlich verwendeten STRs scheitert bzw. nicht mehr möglich ist. Dies ist gerade bei sehr wenig oder hoch degradiertem DNA der Fall. Als Beispiel sind telogene Haare, Haarschäfte und Knochenmaterial zu nennen, bei denen die Kern-DNA weitgehend degradiert bzw. nicht mehr vorhanden ist [BL98]. Zellkern-DNA-Profile besitzen gegenüber mtDNA-Analysen eine höhere biostatistische Aussagekraft, jedoch weist mtDNA einige methodische Stärken auf, welche die Möglichkeiten einer Zellkern-DNA-Analyse übertreffen. Zum einen ermöglicht die hohe Kopienzahl an mtDNA-Genomen die Zugänglichkeit für molekulargenetische Untersuchungen, zum anderen weist mtDNA eine höhere Stabilität gegenüber Degradation auf, was auf die Lage und die Struktur zurückzuführen ist. Durch die ausschließlich maternale Weitergabe der mtDNA lassen sich weiterhin Schlussfolgerungen auf die Populationsgeschichte des modernen Menschen ziehen. Voraussetzung hierfür ist die Sequenzvariabilität der mtDNA innerhalb und zwischen Populationen, Volksstämmen oder Sprachgruppen. Die ermittelten mtDNA-Haplotypen können in einen „Stammbaum“ integriert werden, mit dem versucht wird, die Entstehung und Entwicklung der rezenten Haplotypen aus einer gemeinsamen Wurzel zu strukturieren [GR07]. Eine Sequenzvariabilität kann mitunter durch sogenannte *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) hervorgerufen werden. Diese Einzelbasenaustausche in der mtDNA des Menschen können nicht nur nachteilige Auswirkungen im Sinne von der Entstehung bestimmter Krankheiten, wie z.B. Morbus Parkinson besitzen. Im forensischen Fokus können sie der Zuordnung von Spuren zum Spurenverursacher dienen. Werden ausreichend viele mtSNPs untersucht, wird es sogar möglich personenbezogene Individualprofile zur Personenidentifikation zu erstellen. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass dafür ca. 50 bis 100 mtSNPs aus dem kodierenden und nichtkodierenden Bereich der mtDNA untersucht werden sollten, um die Diskriminationskraft der mtSNP-Profile zu erhöhen. Aus labor-technischer Sicht stellt die mtDNA-Analyse eine bewährte Alternative bei forensischen Proben dar, deren STR-Analyse wenig erfolgversprechend zu sein scheint. Jedoch stößt die mtDNA-Analyse bei der Untersuchung von Mischspuren, verursacht durch zwei oder mehr Individuen, zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch an ihre Grenzen. Dabei liegt die Schwierigkeit in der Unterscheidung einer „echten“ Heteroplasmie und der Vermischung der mtDNA von mindestens zwei Personen. So vermittelt eine Vermischung zweier Nukleotide an einer Nukleotidposition den Eindruck einer Heteroplasmie und lässt keine Aussage über mehrere beteiligte mtDNA-Haplotypen zu [Par09]. Mittlerweile ist weitgehend bekannt, welche Positionen des mtGenoms besonders gut als Marker für eine mögliche Heteroplasmie zu beobachten sind. Jedoch existieren für die Auswertung solcher uneindeutigen Mischprofile keine genauen Angaben für eine exakte Trennung von einer möglichen Heteroplasmie und einer Verunreinigung oder Vermischung von mtDNA-Typen. Hier befindet sich die mtDNA-Analyse noch in einer Grauzone.

1.3 Unterteilung der mitochondrialen Haplogruppe H mit Hilfe mitochondrialer SNPs

Wie bereits beschrieben, können mitochondriale Sequenzen, welche das gleiche Sequenzmotiv aufweisen, einer gemeinsamen mitochondrialen Haplogruppe zugeordnet werden. Dies ist besonders aus anthropologischer und populationsgenetischer Sicht von großem Interesse. Die Grundlage für eine Zuordnung ähnlicher oder identischer Haplotypen zu einer gemeinsamen Haplogruppe erfolgt im Regelfall durch die Sequenzierung der hypervariablen Segmente I und II der Kontrollregion bzw. des gesamten mitochondrialen Genoms [GPA⁺06]. Es ist bekannt, dass besonders die hypervariablen Segmente I und II einer hohen Mutationsrate unterliegen, im Vergleich zu kodierenden Regionen der mtDNA. Die Analyse genetischer Variationen der hypervariablen Segmente I und II bildet die Basis für eine Beschreibung mitochondrialer Sequenzen. Für eine nähere Unterscheidung dieser Sequenzmuster ist es jedoch sinnvoll weitere Polymorphismen, wie z.B. mtSNPs aus der kodierenden Region zu charakterisieren. Diese binären Marker ermöglichen weit verbreitete Haplogruppen näher zu unterteilen und im Hinblick auf Migrationsereignisse zu analysieren [GPA⁺06]. Allein der Nachweis von ein bis zwei Positionen in der kodierenden Region der mtDNA stellt hilfreiche Informationen über die Zugehörigkeit zu einer Makro- oder Subhaplogruppe bereit [SBMR07].

Ein interessantes Beispiel hierfür ist die im europäischen Raum am weitesten verbreitete Haplogruppe H. 40 % bis 50 % der Europäer tragen diese mtHaplogruppe. Aufgrund einer hohen Häufigkeit des Vorkommens und der Verteilung der Haplogruppe H in Europa scheint diese beim Genfluss in Westurasien eine besonders große Rolle gespielt zu haben. Der Ursprung aller in Europa vertretenen mitochondrialen Haplogruppen (H, I, J, K, T, U2e, U3, U4, X und W), mit Ausnahme von U5 und V, liegt in Vorderasien [ARM04]. Viele Arbeiten haben sich bereits mit der Unterteilung der Haplogruppe H in ihre Subcluster beschäftigt. Die wohl detaillierteste Unterteilung wurde in der Arbeit von Achilli et al. vorgenommen, in welcher 15 Subcluster (H1 - H15) definiert wurden (Abbildung 1.4) [GPA⁺06]. Dabei unterschieden sich die Häufigkeitsverteilungen der Subcluster unter sich, sodass im europäischen Raum verschiedene geografische Verteilungsmuster beobachtet werden konnten. Mit Hilfe von RFLP-Screenings kann die Haplogruppenzugehörigkeit der zu analysierenden Sequenzen zunächst bestimmt werden. Im Anschluss kann dann mittels verschiedener Multiplex SNaPshot-Assays versucht werden, spezifische Mutationen der Subhaplogruppen in der kodierenden Region der mtDNA zu detektieren.

Zusammengefasst wird es mit einer Unterteilung der Haplogruppe H in Subcluster möglich die Geschichte moderner menschlicher Populationen nachzuvollziehen. Im forensischen Bereich wird die Tatsache der Unterteilung dann Anwendung finden, wenn Beweisprofile mit denen einer großen Gruppe an Verdächtigen abgeglichen werden müssen. Damit wird ein zeitaufwendiges Sequenzieren aller Personen vermieden, indem lediglich Übereinstimmungen zwischen den Profilen der verdächtigen Personen mit dem Beweisprofil gesucht werden [GPA⁺06].

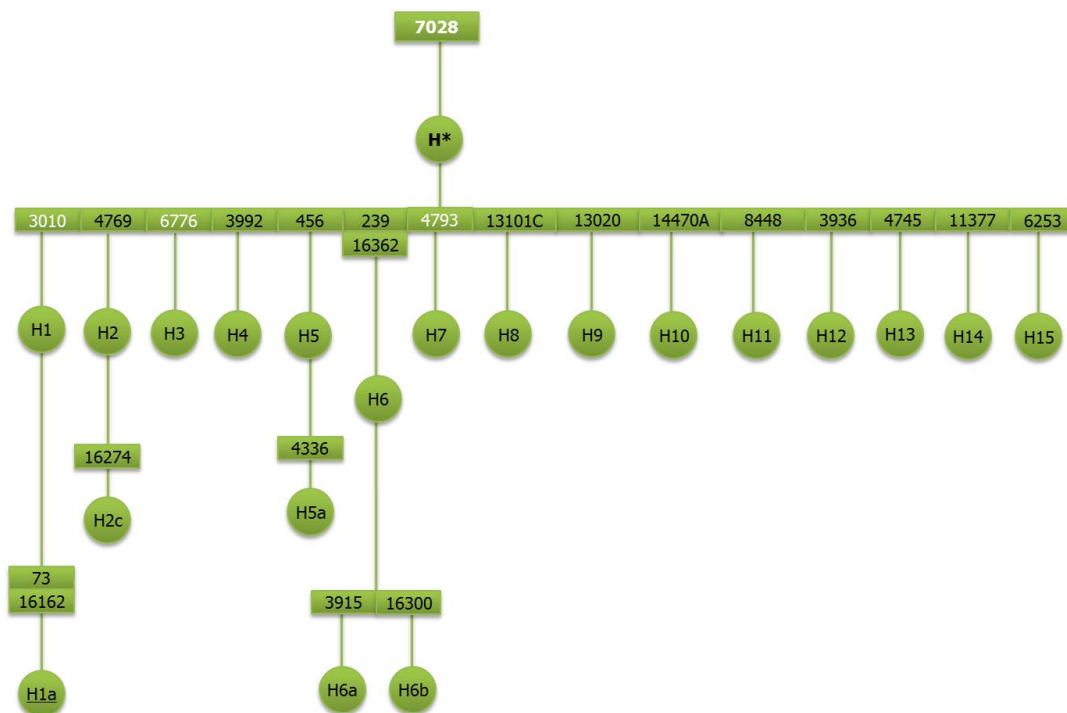


Abbildung 1.4: **Unterteilung der mitochondrialen Makrohaplogruppe H (mod. nach [GPA⁺06]).**

Die Abbildung zeigt die Unterteilung der Makrohaplogruppe H in die 15 Subhaplogruppen. Erst mit der Typisierung von Position 7028 kann davon ausgegangen werden, dass die zu untersuchende CRS-Sequenz der Haplogruppe H angehört. Alle Sequenzen, die keiner der 15 Subhaplogruppen zuzuordnen sind, gehören der paraphyletischen Gruppe H* an. Jeder Abzweig ist durch Mutationen in den Rechtecken beschrieben. Zusätzlich gefundene Untergruppen wurden unterstrichen. Diese Untergruppen sind der untersuchten Population in der Arbeit von Grignani, Peloso und Achilli, zuzuordnen [GPA⁺06]. Sämtliche Mutationen werden hier als Transitionen angenommen. Nukleotidaustausche in Form von Transversionen sind gekennzeichnet. In Bezug auf die vorliegende Arbeit, wird es ebenfalls möglich eine grobe Zuordnung von Sequenzen in die Subhaplogruppen H1, H3 und H7 vorzunehmen. Weiß hervorgehobene Positionen entsprechen untersuchten mtSNPs in der vorliegenden Arbeit.

1.4 Aufbau des Knochengewebes

Makroskopisch betrachtet ist der Knochen aus zwei Hauptarchitekturen aufgebaut. Einer außenliegenden kompakten Schicht, der *Substantia compacta* und einer im Knocheninneren liegenden *Substantia spongiosa*. Die äußere Rindenschicht (*Substantia compacta*) ist speziell bei langen Röhrenknochen besonders gut ausgeprägt und kann hier mehrere Millimeter dick sein. Zu den Röhrenknochen (*Ossa longa*) zählen lange und kurze Knochen der oberen und unteren Gliedmaßen. Das Innere der Gelenkenden und auch das der Schaftansätze besteht aus einem Netzwerk aus Knochenbälkchen (*Substantia spongiosa*). Das Netzwerk ist dynamischen Umbauprozessen ausgesetzt, was an der Beanspruchung der betrachteten Knochenregion liegt [CCTW⁺12]. Mikroskopisch ist der Knochen durch ein kompaktes Lamellensystem (Osteone) charakterisiert, welches die funktionelle Einheit des Knochens bildet. Gebildet wird diese Einheit durch Osteozyten und der zwischen diesen liegenden Interzellulärsubstanz (Knochenmatrix). Die Knochenmatrix besteht aus einer Reihe von charakteristischen Knochenzellen, wie den Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Abbildung 1.5). Durch knochenaufbauende Zellen, den Osteoblasten, wird Knochengewebe an der Außenseite des Knochens angebaut. Ebenfalls produzieren Osteoblasten Hormone, wie Prostaglandin oder auch die alkaline Phosphatase, ein Enzym, welches an der Mineralisation des Knochens beteiligt ist [CCTW⁺12]. Wiederum bauen die Osteoklasten an der Innenseite Knochengewebe ab. Osteoblasten, die ringsum von Matrixsubstanz umgeben sind, bezeichnet man analog zu den Knorpelzellen als Osteozyten. Sie haben die Kanälchen behalten, mit denen sie mit den anderen Zellen in Verbindung stehen. Über diese Verbindungen ist ein Stoff- und Informationsaustausch möglich. Neben dem Zahnmateriale ist ausdifferenziertes Knochengewebe die härteste Substanz des Körpers. Bewirkt wird die physikalische „Härte“ des Knochens durch ein Zusammenwirken von organischen und anorganischen Bestandteilen und der Einlagerung von Kalksalzen in die fibrillenreiche Grundsubstanz [Lip11]. Die Kalksalze liegen überwiegend als Hydroxylapatit, d.h. als kristallines Kalziumphosphat vor. Eine erhöhte Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen wird durch die enge Verwebung anorganischer und organischer Substanzen im Knochen sowie die besondere Architektur von Knochenmatrix und Osteozyten erreicht [BHHH99].

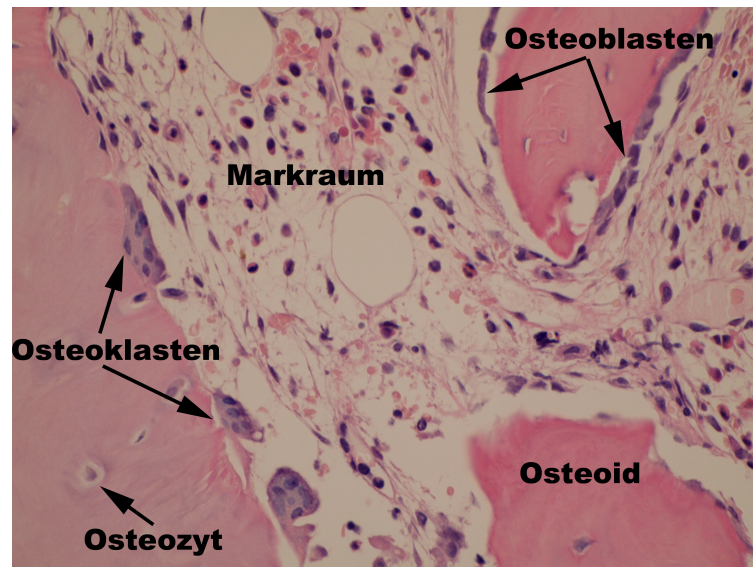


Abbildung 1.5: **Histologische Struktur eines Knochens.**

Gezeigt ist der histologische Aufbau eines Knochens. Osteoblasten und Osteozyten stammen von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen ab, Osteoklasten von hämatopoetischen Stammzellen. Osteoblasten haben beim Menschen eine Lebensdauer bis 8 Wochen, sie produzieren $0,5 - 1,5 \mu m$ Osteoid (frisch synthetisierte Grundsubstanz, in die dann Mineralien eingelagert werden). Die Aufnahme wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. J.-O. Habeck, Zentrum für Histopathologie Chemnitz, zur Verfügung gestellt.

1.5 DNA Degradation in Knochen- und Zahngewebe

Bei der molekulargenetischen Untersuchung von Knochenmaterial mit einer hohen Bodenliegezeit, ist davon auszugehen, dass zum einen nukleäre DNA nur noch schwer nachweisbar ist und zum anderen vorhandene genomische oder mtDNA aufgrund der Lagerungsbedingungen verändert bzw. beschädigt sein kann. Nicht nur die Menge an DNA sondern auch die Qualität kann bei STR-Analysen oder SNP-Typisierungen von entscheidender Bedeutung sein [CCTW⁺12]. Eine Reihe von Prozessen wirken post-mortem auf das biologische Material ein und beeinflussen die Qualität der DNA. Kenntnisse über diese Prozesse sind unverzichtbar, wenn es darum geht, optimale Labor-techniken zur Isolation, Aufreinigung und Amplifikation genomischer und der mtDNA zu wählen. Neben einer enzymatischen Degradation der DNA durch Endo- und Exonukleasen, spielen chemische und oxidative Prozesse beim Abbau zweifellos eine wichtige Rolle. So erschwert der Prozess einer fortschreitenden hydrolytischen Spaltung und die Zerstörung der Nukleotide durch Oxidationsprozesse eine anschließende Amplifikation. Aus diesem Grund sind für die Amplifikation von gDNA oder mtDNA-Abschnitten Primer zu wählen, die ein Vervielfältigen kurzer DNA bzw. mtDNA-Abschnitte ermöglichen. Weiterhin kann das Vorhandensein von endogenen und exogenen Inhibitoren die Amplifikation negativ beeinflussen [UM04]. Neben autolytischen Prozessen ist der Abbau der DNA zusätzlich von Umweltfaktoren abhängig. Verschiedene Studien haben

gezeigt, dass nicht nur Temperaturschwankungen von wenigen °C (vorwiegend Temperaturerhöhungen) sondern auch eine erhöhte Feuchtigkeit, die DNA-Degradation im Knochen beschleunigen. Glaubt man einer Studie nach Rankin et al. [RNBL96], so beschleunigen die mikrobielle Aktivität zusammen mit einer hohen Feuchtigkeit des Bodens die Degradation in einem höheren Maße als Faktoren wie Strahlung oder Hitze. Daraus ist abzuleiten, dass auch der Lagerungs- bzw. Liegeort des Knochenmaterials von entscheidender Bedeutung ist. Es wird vermutet, dass die höchste DNA-Ausbeute aus Knochen erreicht werden kann, wenn sie an der Oberfläche gelagert wurden. Dafür spricht eine Studie aus dem Jahr 1991 von Hochmeister et al. [HBB⁺91]. Dabei war die DNA-Ausbeute von Knochen, die in der Erde vergraben waren, im Vergleich zu denen, die sich an der Oberfläche befanden, weitaus geringer [HBB⁺91].

Neben den erwähnten Umweltfaktoren, die in einem hohen Maß die Degradation der DNA in Knochen und Zähnen beeinflussen, spielt weiterhin der Feinbau und das Wissen über den Degradationsvorgang eine wichtige Rolle. So wird mitunter argumentiert, dass der Abbau der DNA im mineralisierten Kollagen von Knochen und Zähnen langsamer voran schreitet. Der Grund dafür soll die Adsorption der DNA an den hydroxylapatit-Apparat des Knochen- oder Zahnmateriels sein. Weiterhin ist es möglich, dass sich mtDNA während Resorptions- und Formationsprozessen im Knochen vorwiegend in der Knochenmatrix befindet [CCTW⁺12]. Die Odontoblastenfortsätze von Zähnen enthalten zahlreiche Mitochondrien, die durch den umgebenen Zahnschmelz und das Wurzelzement vor extremen Umwelteinflüssen geschützt werden. Durch diesen Schutz bleibt die mtDNA auch dann noch gut erhalten, wenn andere Gewebe des menschlichen Körpers aufgrund ihrer hochgradigen Zersetzung für eine DNA-Analyse nicht mehr geeignet sind [MPYT99]. Mornstad et al. [MPYT99] fanden heraus, dass die Konzentration mitochondrialer DNA im Dentin mit steigendem Lebensalter eines Menschen sinkt. Sie gingen davon aus, dass dies aufgrund der zunehmenden Verschließung der Dentinkanälchen durch das Sekundär-Dentin und der daraus resultierenden Zerstörung der Odontoblasten inklusive der enthaltenen mtDNA der Fall ist. Wiederum gehen Experten davon aus, dass während des Mumifikationsprozess der Abbau der DNA in knöchernen Strukturen verlangsamt wird [CCTW⁺12]. Ebenfalls scheint die Art der Knochen in Bezug auf den Erhalt der DNA wichtig zu sein. In Bezug auf den Feinbau, scheint die Knochenmatrix langsamer zu degradieren, als das Knochenmark [PBR88]. Werden DNA-Ausbeuten aus alten Knochen mit dem Feinbau in Relation gesetzt, so beurteilten MacHugh et al. kompakte Knochen aufgrund ihrer geringeren Kontamination durch Bakterien und Pilze als geeigneter für DNA-Untersuchungen als Knochen mit einem erhöhten spongiösen Anteil [MEB⁺00]. Durch die Vielfalt an Einflussfaktoren ist eine zeitliche Eingrenzung für das Überdauern von aDNA schwierig. In der Literatur sind dazu variable Angaben zu finden. So geben Willerslev und Cooper [WC05] an, dass 100 bis 500 bp lange Fragmente in temperierten Zonen bei etwa 10 °C über einen Zeitraum von ca. 10.000 Jahre noch nachweisbar sein sollten. Für Proben aus dem Permafrost wird die Nachweisgrenze auf 100.000 Jahre geschätzt [WC05].

Ungeachtet der zum Teil widersprüchlichen Argumentationen der Experten, ist jedoch klar, dass die Degradation der DNA in Knochen mit einer hohen Bodenliegezeit und historischem Knochenmaterial kein straight-forward Prozess ist. In diesem Zusammenhang ist ein umfassendes Verständnis über den Feinbau des Knochen wichtig, um z.B. effektive Methoden für die Isolation von aDNA zu wählen.

Aufgrund der geringen Mengen an DNA in sehr alten Knochen sollten die Aufarbeitungsschritte bis hin zur Amplifikation erhöhten labortechnischen Vorsichts- und Reinheitsmaßnahmen unterliegen. Die Bearbeitungsschritte bis zur Amplifikation des DNA-Extraktes sind besonders anfällig für Kontaminationen, da die DNA nur noch in sehr geringen Mengen vorliegt. Die Bearbeitung der DNA-Isolate in Form von prä- und post-Amplifikationsschritten sollte daher in getrennten Räumlichkeiten durchgeführt werden. Um Kontaminationen zu vermeiden ist dies ein zwingender Schritt, da sich aktuelle Fremd-DNA aufgrund ihres Erhaltungszustandes gegenüber alter DNA (aDNA) durchsetzt. Infolge des Amplifikationsprozesses würde diese Fremd-DNA somit besser amplifiziert werden.

1.6 *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) im mitochondrialen und genomischen Kontext

Als ergänzendes Verfahren für die forensische DNA-Analyse wird häufig die Untersuchung der genetischen Heterogenität auf der Basis von Einzelbasensequenz Polymorphismen in Betracht gezogen. Durch die Sequenzierung des humanen Genoms wurde es möglich über drei Millionen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) zu detektieren. Im Hinblick auf die Verteilung dieser Sequenzpolymorphismen ist davon auszugehen, dass diese mit einer mittleren Dichte von ca. 1 SNP/1000 bp verteilt in kodierenden als auch in nichtkodierenden Teilen des Genoms vorkommen [Bur06]. SNPs zählen, anders als die *Short Tandem Repeats* (STR), zu den binären Sequenzpolymorphismen, welche durch den Austausch von einzelnen Nukleotiden entstehen. Im Gegensatz zu anderen Polymorphismen, wie die Satelliten-DNAs, handelt es sich bei SNPs um biallelische Marker. Somit beträgt der Informationsgehalt, der aus der Untersuchung eines SNPs gewonnen wird, etwa 20 - 30 % des Informationsgehaltes eines STRs. Das liegt an der geringeren Anzahl an möglichen Allelen an einem Locus [But11].

Im Hinblick auf forensische mtDNA-Analysen wird zunehmend an der Etablierung relevanter mitochondrialer SNP-Assays gearbeitet. Die Untersuchung solcher binären Sequenzpolymorphismen des mitochondrialen Genoms bringt diverse Vorteile mit sich. Am häufigsten werden bei der mtDNA Mutationen betrachtet, die durch Substitutionen einzelner Nukleotide entstehen. Bei Substitutionen handelt es sich entweder um Transitionen¹ oder Transversionen². Der Größenunterschied gegenüber STRs macht diese

¹ Austausch von Purinbase gegen Purinbase bzw. Pyrimidinbase gegen Pyrimidinbase

² Austausch von Purinbase gegen Pyrimidinbase und umgekehrt

binären Marker insbesondere für forensische DNA-Analysen interessant, da lediglich eine variable Nukleotidposition betrachtet wird. Dies ist vor allem bei Proben von Vorteil, deren DNA durch Umwelteinflüsse, wie intensive Sonneneinstrahlung, mikrobiologischen Befall, Feuchtigkeit oder auch schlechte Lagerung stark degradiert ist. Theoretisch reicht es also aus, wenn die Länge der zu amplifizierenden Sequenz lediglich den Polymorphismus umfasst. Im Idealfall also nur etwa 50 bp. Im Falle mitochondrialer SNPs wird hier zusätzlich die Tatsache kaum noch vorhandener chromosomaler DNA einbezogen, sodass lediglich genetische Variationen in Form von SNPs mit Hilfe des stabileren mitochondrialen Biomoleküls betrachtet werden können. Artefakte, wie z.B. Stutterpeaks, die häufig bei STR-Profilen auftreten, können bei der Analyse von SNPs ausgeschlossen werden, was wiederum die Interpretation der Profile erleichtert. Aus populationsgenetischer Sicht wird es ebenfalls möglich mit Hilfe genomischer mitochondrialer SNPs Phänotypen und ethnische Herkünfte vorherzusagen [BCV07]. Die größte Herausforderung bei der mtSNP-Analyse besteht gegenwärtig in der simultanen Amplifikation ausreichend vieler Marker mittels robuster Multiplexverfahren. Ein einzelner biallelischer SNP würde wenig bis gar keine hilfreichen Informationen liefern. Jedoch wird es möglich, mit einer angemessen großen Anzahl und einer intelligenten Kombination von SNPs die Diskriminationskraft zu erhöhen [SPB⁺06]. Aufgrund dessen, dass nur zwei mögliche Allele betrachtet werden, müssen im Vergleich zu STR-Analysen weitaus mehr Marker beurteilt werden. Statistische Analysen haben gezeigt, dass im Durchschnitt 25 bis 45 SNPs analysiert werden müssen, um eine ähnlich gute Diskriminationskraft wie mit 13 STR-Markern zu erhalten. Zusammengefasst werden SNPs mit einem Umfang von 50 bis 100 untersuchten Markern benötigt, um den gleichen Informationsgehalt wie mit zehn bis 16 STR-Systemen zu generieren [GWBG04]. Bei der Analyse mitochondrialer SNPs im forensischen Interessengebiet ist es wichtig eine Kombination aus mtSNPs der kodierenden und nichtkodierenden Region der mtDNA auszuwählen. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll Marker zu nutzen, die aussagekräftige Austauschwahrscheinlichkeiten besitzen und mit keinen pathologischen phänotypischen Veränderungen assoziiert werden [CJO⁺04].

SNPs können generell in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst hierbei SNPs für die Identifikation von Personen. Zwei weitere Gruppen beinhalten solche binären Marker, welche für Abstammungsuntersuchungen oder Ahnenforschung genutzt werden können. Die vierte Gruppe umfasst medizinisch relevante SNPs [Bv08]. So werden in der klinischen Genetik SNPs beispielsweise für die Diagnostik genetisch bedingter Krankheiten verwendet. Bis heute wurden über 200 verschiedene mtDNA Punktmutationen und Deletionen mit diversen Krankheiten in Verbindung gebracht [Ser03]. Die fortschrittliche Entwicklung nationaler und internationaler Datenbanken in den letzten Jahren für die Verwaltung oder auch Katalogisierung genetischer Variationen ermöglicht einen schnellen und präzisen Zugriff auf relevante Informationen über spezifische mtSNPs oder auch genomische SNPs. Im Jahr 1999 wurde das SNP Consortium gegründet, dessen Ziel in der Entwicklung einer „high-density SNP map“ des menschlichen Genoms bestand. Erfolgreich konnten mehrere Millionen SNPs charakte-

riert und in entsprechende Datenbanken eingetragen werden [But11]. Darunter eine der bekanntesten Datenbanken, die dbSNP des National Institutes of Health, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) [SWK⁺01]. Das SNP Consortium (TSC) bildete die Grundlage für das internationale HapMap-Projekt, welches sich an das Human Genome Project anschloss. Das Projekt involvierte die Typisierung mehrerer Millionen SNPs von 270 Individuen aus Afrika, Europa und Asien (<http://www.hapmap.org/>) [GBHW03]. Weiterhin hat die Universität von Santiago de Compostela in Spanien ein Webinterface entwickelt für die Evaluierung von SNP-Populationsdaten. Mit dieser Website wird es ebenfalls möglich Allelhäufigkeiten, ausgewählter SNPs der SNPforID 52plex and 34plex-Assays zu überprüfen. Im mitochondrialen Kontext stehen dem interessierten Nutzer ebenfalls eine Reihe nützlicher Datenbanken zur Verfügung. Diese stellen zum einen Informationen über das mitochondriale Genom und zum anderen detektierte mtSNPs und Populationsdaten bereit. Ein Beispiel ist die Datenbank MITOMAP, die mtDNA Sequenzen als konsolidierendes Element für Informationen über die mitochondriale Genom-Struktur, Funktion, pathogene Veränderungen und ihre klinischen Eigenschaften, Populationsdaten und Gen/Gen-Interaktionen nutzt [BLN⁺05]. Die Datenbank mtSNP verwaltet über 3000 mtSNPs mit Locusspezifischen Informationen und Frequenz-Tabellen [FNT05]. Eine der größten mtDNA Datenbanken ist die Datenbank EMPOP [BNP⁺07]. Diese Datenbank verwaltet weltweit vorkommende mtDNA Kontrollregionhaplotypen. Sie wurde am Institut für Rechtsmedizin, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mathematik der Universität Innsbruck entwickelt.

1.7 Analysemethoden für SNPs

In den vergangenen Jahren wurde eine große Anzahl verschiedenener Technologien für die SNP-Typisierung entwickelt. Basierend auf Allel-Diskriminations und Detektions-Plattformen ist die Mehrheit der Methoden fünf biochemischen Grundprinzipien zu zuordnen, welche an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden sollen:

- Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotidsonden,
- PCR mit allelspezifischen Primern,
- Minisequenzierung/Primerextension-Reaktion,
- Ligation allelspezifischer Oligonukleotide,
- Restriktionsendonuklease/Flap Endonuklease Verfahren

Ein limitierender Faktor dieser Methoden ist zweifellos die Fähigkeit einer Analyse im Multiplexverfahren. Für eine schnelle und aussagekräftige Analyse ist der komplexe Nachweis mehrerer molekularer Marker, wie z.B. mtSNPs, unerlässlich. Durchgesetzt hat sich hier insbesondere die Minisequenzierung, welche sich als robustes und recht simples Verfahren für die Analyse molekularer Marker in vielen Laboren etabliert hat.

1.7.1 Minisequenzierung (*Einzelbasenverlängerung*)

Sequenzierungsstrategien, welche auf der Amplifikation besonders kleiner Amplikone der mtDNA basieren, kommen insbesondere dann zum Einsatz, wenn stark degradiertes Untersuchungsmaterial auf molekularer Ebene charakterisiert werden soll. Allerdings sind diese Strategien sehr zeitaufwendig und kostspielig. Ebenso erfordern diese eine intensive und andauernde Laborarbeit. In den letzten Jahren erlangte gerade das Verfahren der Minisequenzierung zunehmend an Beliebtheit unter Molekulargenetikern und findet seither in vielen forensischen Standardlaboren Anwendung. Verglichen mit anderen SNP-Genotypisierungsmethoden, weist diese Technik einige bedeutsame Vorteile auf. Zum einen kann durch Einbeziehung konkreter phylogenetischer Daten oder Ansätze die Diskriminationskraft von mtDNA-Analysen erhöht werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit mit Hilfe der Minisequenzierung mehrere mtSNPs aus der kodierenden oder nichtkodierenden Region der mtDNA in robusten Multiplexansätzen zu analysieren. Andere Technologien wie die Pyrosequenzierung und Microarrays sind hingegen ungeeignet für Multiplexanalysen und benötigen zudem eine höhere Anzahl zusätzlicher Schritte, bevor eine Detektion markierter Oligonukleotide erfolgen kann. Durch die Analyse mehrerer mtSNPs in Multiplexansätzen kann die Gefahr möglicher Fehlrekombinationen vermieden werden. Dies kann häufig bei Genotypisierungsversuchen von nur einer SNP-Position auftreten. Zudem ist diese Technik im Vergleich zu DNA-Microarrays und MALDI-TOF eher kostengünstig und erfordert nur geringe Mengen an Template-DNA.

Das Prinzip der Minisequenzierung beruht hauptsächlich auf der Erzeugung einzelsträngiger DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Dazu schließt das Prinzip die Markierung des entsprechend zu analysierenden Nukleotids: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T) ein, damit sie später detektiert und voneinander unterschieden werden können. Durch enzymatische Reaktionen, die sich thermozyklisch wiederholen, wird das Prinzip der Minisequenzierung umgesetzt. Im ersten Schritt erfolgt, ausgehend von einem enzymatisch gereinigten und amplifizierten DNA-Target (oder mtDNA-Target) eine Einzelbasenverlängerung. Dabei bindet ein spezifischer Analyseprimer genau ein Nukleotid vor der polymorphen Position, an die einzelsträngige DNA (Abbildung 1.6). Für die Unterscheidung mehrerer detektierbarer Oligonukleotide, werden die Analyseprimer häufig durch einen zusätzlichen, unspezifischen Überhang am 5'-Ende verlängert. Dies ermöglicht die Analyse von mtSNPs im Multiplexverfahren. Nach dem Primerannealing erfolgt der Einbau eines komplementären, fluoreszenzmarkierten ddNTPs am 3'-Ende des Oligonukleotids durch eine DNA-Polymerase. Ist dieses markierte Nukleotid komplementär zur polymorphen Position so erfolgt ein Kettenabbruch, da die fehlende 3' OH-Gruppe am ddNTP eine weitere Strangsynthese unmöglich macht. Nach der Markierung schließt sich die Auftrennung unterschiedlich langer und markierter Oligonukleotide an. Die Detektion markierter Oligonukleotide kann mit Hilfe von Technologien wie der Kapillarelektrophorese, MALDI-TOF, massenspektroskopischen Verfahren oder über Microarrays erfolgen.

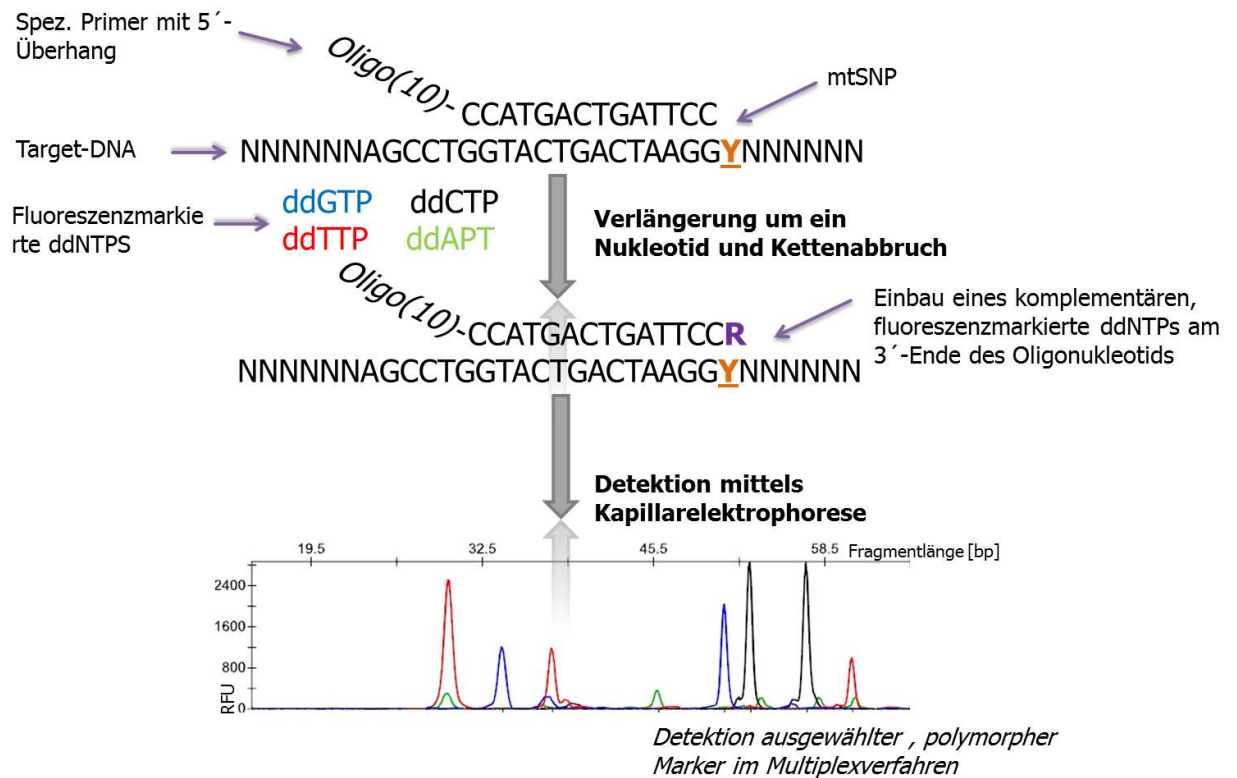


Abbildung 1.6: **Ablauf Minisequenzierung (SNaPshot-Methodik).**

Die Abbildung umfasst die nötigen Schritte für eine Minisequenzierung mehrerer mtSNPs, analog der SNaPshot-Methodik der Firma Applied Biosystems. Im ersten Schritt erfolgt die Anlagerung eines spezifischen Primers, der durch einen sequenzspezifischen Überhang am 5'-Ende verlängert wurde. Dies ermöglicht eine längenbasierte Unterscheidung detektierbarer Fragmente. Durch eine DNA-Polymerase wird im nächsten Schritt ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP (R), komplementär zur analysierten, polymorphen Position (Y), eingebaut. Ein Fehlen der OH-Gruppe am 3'-Ende des ddNTPs, führt zu einem Kettenabbruch. Der spezifische Primer wurde so durch ein einzelnes Nukleotid verlängert. Die Detektion farbmarkierter, einzelsträngiger Oligonukleotide erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Ein längenbasiertes Auftrennen der Fragmente und die Unterscheidung polymorpher Positionen durch spezifische Markierungen eingesetzter ddNTPs ermöglichen ein charakteristisches mtSNP-Profil, wie es hier abgebildet ist.

1.8 Detektionsverfahren für SNPs

Neben Detektionstechnologien wie der Arrayed Primer Extension (APEX) und MALDI-TOF MS stellt die Kapillarelektrophorese eine einfache und weit verbreitete Möglichkeit dar, um molekulare Marker wie STRs oder auch mtSNPs zu detektieren. Basierend auf unterschiedlich langen Fragmenten, die z.B. über die Minisequenzierung im Voraus amplifiziert wurden, erfolgt die Unterscheidung spezifischer Marker. Die notwendigen Geräte stehen den meisten forensischen Labors zur Verfügung, da die für Identifikation verwendeten STR-Marker über dieselbe Detektionsmethodik analysiert werden.

1.8.1 Kapillarelektrophorese

Mit der zunehmenden Etablierung der Kapillarelektrophorese für die automatisierte Sequenzanalyse wurden andere, zeitaufwendigere Detektionsmethoden verdrängt. Mit der Kapillarelektrophorese verkürzt sich die Analysezeit pro eingesetzter Probe deutlich. Zugleich wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die Automatisierung erhöht.

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese (KE) beruht auf der Detektion einzelsträngiger, fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente mittels Lasertechnik sowie der Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente in einer mit Polymer gefüllten Glaskapillare. Dadurch wurde die Trennschärfe der Fragmentanalyse enorm gesteigert. Ein übliches Kapillarelektrophoresemessgerät ist aus den folgenden Hauptelementen aufgebaut: einer sehr feinen Kapillare, zwei Puffergefäßen und zwei Elektroden, welche über eine Hochspannungsstromversorgung verbunden sind. Weiterhin komplettieren Bestandteile wie eine Quelle für die Anregung des Lasers, ein Fluoreszenzdetektor und einen Autosampler das System (Abbildung 1.7). Für die Trennung von DNA-Fragmenten werden meist Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 μm verwendet. Messgeräte der Firma Applied Biosystems (ABI Genetic Analyzers) sind überwiegend mit Kapillaren mit einem „injection-to-detecting“ Abstand von 36 cm bis 50 cm ausgestattet [But11]. Im Unterschied zur konventionellen Auftrennung mit Hilfe einer Gelelektrophoresevorrichtung, dient ein viskoses Polymer als Sieb für die Auftrennung von DNA-Molekülen. Dabei wirken die linearen, flexiblen Polymerketten als Hindernisse für die negativ geladene DNA. Diese Ketten müssen auf dem Weg zur positiv geladenen Anode durch die DNA-Moleküle navigiert werden. Ein gebräuchliches Verfahren für die Probeninjektion ist die elektrokinetische Injektion, bei der eine definierte Spannung an ein Ende der Kapillare angelegt wird. Durch eine positive Spannung wird die Probe förmlich in die Kapillare gezogen. Über dieses Prinzip werden kurze, nah beieinander liegende Zonen erzeugt, die eine hochauflösende Trennung von DNA-Fragmenten bewirken. Bedingt durch die Polymerchemie bewegen sich größere DNA-Moleküle langsamer durch die Kapillare als kürzere, beweglichere Fragmente. Das unterschiedliche Wanderungsverhalten der Biomoleküle unterstützt eine längenbasierte Auftrennung, wodurch eine exakte Unterscheidung betrachteter Allele erfolgen kann [BBCM04]. Die Detektion der Fragmente

erfolgt automatisch durch das KE-Gerät, indem die Zeitspanne von der Probeninjektion bis zur Probendetektion gemessen wird. Dies geschieht durch einen am Ende der Kapillare platzierten Laser. An einer fixen Position wird die Kapillare durch diesen Laser durchleuchtet und DNA-Fragmente durch dieses Fenster detektiert. Abhängig von der Migrationsgeschwindigkeit gelangen kleinere DNA-Moleküle schneller an dem Detektionsfenster vorbei als größere. Die Migrationsgeschwindigkeit korreliert mit der Länge der DNA-Fragmente bzw. der Nukleotidanzahl. Im Ergebnis werden die Daten als Funktion der relativen Fluoreszenz (RFU) aufgetragen, abhängig von den jeweiligen Emissionen eingesetzter Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs. Das Fluoreszenzemissionssignal kann in Relation zu gemessenen DNA-Fragmenten gesetzt werden und ermöglicht ein grobes Quantifizieren detektierter DNA-Fragmente. Es gibt mehrere Komponenten, die Einfluss auf DNA-Trennungen innerhalb der KE-Systeme haben: das verwendete Polymer für die Trennung der Fragmente, die Kapillare, die Elektrophorese-Puffer und die Spannung [BBCM04].

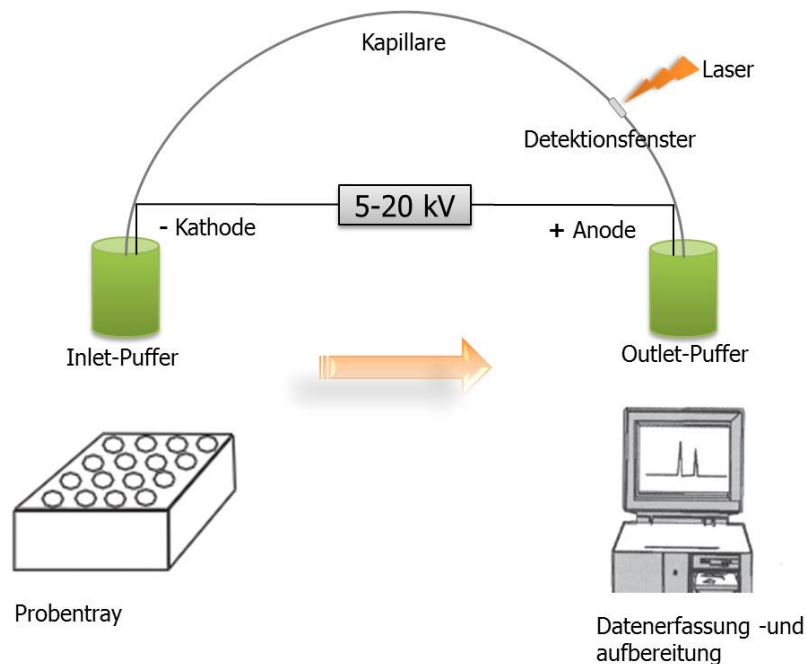


Abbildung 1.7: **Schema einer Kapillarelektrophoreseeinheit (mod. nach [But11]).**

Die Abbildung zeigt eine Messvorrichtung für die Detektion von DNA-Fragmenten mittels Kapillarelektrophorese. Zwei Puffergefäße (Inlet- und Outlet-Puffergefäß) sind über eine ca. 50 cm lange, sehr feine Glaskapillare verbunden. In der Kapillare befindet sich ein Polymer, welches das Wanderungsverhalten unterschiedlich langer DNA-Fragmente mitbestimmt. Die Proben werden in einem Probenständer- oder tray platziert. Über eine positive angelegte Spannung wird die Probe in die Kapillare injiziert. DNA-Moleküle wandern, abhängig von ihrer Größe, unterschiedlich schnell durch das Polymer. Fluoreszenzmarkierte Fragmente werden an einer definierten Stelle über ein Detektionsfenster am Ende der Kapillare mit Hilfe eines Laserstrahls detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgt automatisch unter Zuhilfenahme einer spezifischen Analysesoftware.

1.9 Ausgewählte mtSNP-Systeme für die Etablierung

Für die Etablierung mitochondrialer SNPs in der forensischen Molekulargenetik wurden 24 polymorphe Positionen sowohl aus der kodierenden Region als auch aus der nicht-kodierenden Region der mtDNA ausgewählt. Die Auswahl der mtSNPs wurde durch zwei Arbeiten aus dem Gebiet der forensischen mtSNP-Analyse unterstützt. Zum einen diente die Arbeit von P.M. Vallone [VJP04] als Grundlage für die Auswahl von acht, bereits analysierten mtSNPs. Weitere 16 mtSNPs wurden aus der Arbeit von A. Brandstätter übernommen [BPP03]. Für in der forensischen Praxis aussagekräftige und komplexe Typisierungsergebnisse wurden das komplette mtSNP-Assay in drei Multiplexansätzen getestet. Hierfür wurden jeweils acht mtSNPs in drei 8-plex-Systemen analysiert. Die Einteilung in die drei 8-plex-Systeme wurde aus den vorgestellten Arbeiten übernommen. Bei der Auswahl der polymorphen Positionen für diese Arbeit spielten Faktoren wie: die Robustheit untersuchter Systeme gegenüber Konzentrationsschwankungen der zu analysierenden Probe und die Fähigkeit für eine Analyse in optimierten Multiplexsystemen, eine große Rolle. In diesem Zusammenhang sollten die Systeme die Fähigkeit besitzen, mögliche Heteroplasmien oder Verunreinigungen in der Probe anzudeuten. Im Zusammenhang mit stark degradiertem Untersuchungsmaterial oder Low-Level DNA sollten ausgewählte mtSNP-Systeme besonders sensitiv gegenüber wenig Template-DNA sein. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Berücksichtigung von kurzen Amplifikaten im Bereich von 80-180 bp. Diese Voraussetzungen werden durch die drei 8-plex-Systeme erfüllt. Im Allgemeinen sollten bei der Auswahl forensisch relevanter mtSNP-Systeme verschiedene Kriterien erfüllt sein. Zum einen sollte darauf geachtet werden, dass ausgewählte Marker in keinem krankheitsassoziiierenden Kontext stehen. Weiterhin sollten diese Marker ausreichend polymorph sein. Dadurch wird die Diskriminationskraft im Hinblick auf Identifizierungsfälle erhöht [CJO⁺04].

Das aus der Arbeit von Vallone et al. entnommene mtSNP-System dient der Zuordnung von identischen HVI/HVII-Sequenzen in die europäische Subhaplogruppe H:1. Mit einer Häufigkeit von 7,1 %³ ist diese mitochondriale Haplogruppe am weitesten in Europa vertreten. Das System umfasst im Ursprung 11 polymorphe Positionen, 10 aus der kodierenden und eine aus der nichtkodierenden Region der mtDNA. Zehn der mtSNPs repräsentieren Transitionvarianten. Eine Ausnahme bildet hier die Position 14470 (T/A), welche eine Transversion der Nukleotide kennzeichnet. Die Mehrzahl dieser Punktmutationen charakterisieren stille Mutationen ohne phänotypische Effekte. Die Position 16519 besitzt im Vergleich zu den anderen mtSNPs des Systems die höchste Substitutionsrate und somit die höchste Diskriminationskraft im Hinblick auf die Unterscheidung von HVI/HVII-Sequenzen. Eine im 16S rRNA-Gen lokalisierte Position ist 3010, dessen Varianten Struktur- und Funktionsänderungen der rRNA hervorrufen können. Somit gilt diese Position im eigentlichen Sinne als nicht neutral. Dennoch wurde diese Position nicht aus dem System ausgeschlossen, da keine pathologischen Auswirkungen exakt

³ Häufigkeit wurde durch HVI/HVII-Sequenzierungsdaten von 1,655 Eurpäären bestimmt und aus einer mtDNA-Populationsdatenbank bezogen

vermerkt waren [VJP04]. Aus Kompatibilitätsgründen mit den anderen beiden mtSNP-Systemen wurden für die Etablierung dieses Systems die Positionen 3010 und 7028 ausgeschlossen, da diese im 8-plex-System in der Arbeit von Brandstätter et al. [BPP03] bereits integriert waren. Des Weiteren wurde die Variante an Position 14470 aus dem Multiplexsystem ausgeschlossen, da keine reproduzierbaren Ergebnisse erzeugt wurden.

Die aus der Arbeit von Brandstätter et al. ausgewählten polymorphen Marker dienen der Zuordnung von Individuen zu einer der neun großen europäischen kaukasischen mitochondrialen Haplogruppen. Die selektierten mtSNPs wurden zwei Multiplex-Systemen zugeteilt und über die SNaPshot-Methodik analysiert. Durch eine Kombination der 16 ausgewählten mtSNPs wird eine Haplogruppencharakterisierung mitochondrialer Sequenzen möglich. Dazu weisen diese mtSNPs günstige Häufigkeitsverteilungen in Bezug auf alle neun großen europäischen Haplogruppen (H, I, J, K, T, U, V, W, X) auf [BPP03]. Aus dieser Sicht wurde es möglich, untersuchte Individuen mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes und den durch Mutationen gekennzeichneten Ästen, einer der neun mtHaplogruppen zuteilen. Hierfür sollten die Marker verschiedene Kriterien erfüllen: Zunächst sollten diese eine ausreichend hohe Diskriminationskraft für die Unterscheidung von europäischen mtDNA-Haplogruppen besitzen. In diesem Zusammenhang sollte die Ausgrenzung von nicht zutreffenden mtHaplogruppen durch ein minimales und zugleich spezifisches Set an mtSNPs möglich sein. Die Durchführung sollte in zwei kompakten Multiplexansätzen umsetzbar sein. Des Weiteren wurde das Vorhandensein von degradierter oder Low Level-DNA beachtet. Der überwiegende Teil der in diesen Multiplexsystemen vorgestellten mtSNPs sind stille Mutationen, ohne pathologische phänotypische Effekte (Tabelle 1.1). Nur wenige Positionen gelten in diesen beiden Systemen als nicht neutral, wobei diese Effekte in Kombination mit den anderen Positionen für eine Haplogruppenzuordnung nicht relevant sind [BPP03]. Nachfolgend sind untersuchte polymorphe, mitochondriale Positionen im Überblick den drei untersuchten Multiplexsystemen zugeteilt:

Multiplexsystem 1 (Vallone et al.) [VJP04]: T477C, G4580A, A4793G, T5004C, A7202G, C10211T, C12858T, T16519C

Multiplexsystem 2 (Brandstätter et al.) [BPP03]: A11251G, T14798C, G1719A, C15904T, G709A, G12372A, G3010A, C7028T

Multiplexsystem 3 (Brandstätter et al.) [BPP03]: G13708A, C14766T, G9055A, T6365C, A1811G, G8251A, T6776C, G8697A

mtSNP	Austauschwahrscheinlichkeit Referenzgruppe 1 [CJO ⁺ 04]	Austauschwahrscheinlichkeit Referenzgruppe 2 [IK-PG00]	Art der Mutation	Locus	Art des Austausches
T477C	14 / 241 (5,81 %)	0 / 80 (0,00 %)	stille Mutation	Major non-coding region 1 (1-576 bp)	sub (Transition)
G4580A	26 / 241 (10,79 %)	2 / 80 (2,50 %)	stille Mutation	ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2)	sub (Transition)
A4793G	6 / 241 (2,49 %)	0 / 80 (0,00 %)	stille Mutation	ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2)	sub (Transition)
T5004C	10 / 241 (4,15 %)	1 / 80 (1,25 %)	stille Mutation	ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2)	sub (Transition)
A7202G	2 / 241 (0,83 %)	2 / 80 (2,50 %)	stille Mutation	CO1 (Cytochrome c oxidase subunit I)	sub (Transition)
C10211T	4 / 241 (1,66 %)	0 / 80 (0,00 %)	stille Mutation	ND3 (NADH dehydrogenase subunit 3)	sub (Transition)
C128585T	3 / 241 (1,24 %)	0 / 80 (0,00 %)	stille Mutation	ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5)	sub (Transition)
T16519C	171 / 241 (70,95 %)	52 / 80 (65,00 %)	Mutation wurde bei Migränpatienten analysiert	Major non-coding region 2 (16024 bp - 16569 bp)	sub (Transition)
A11251G	82 / 241 (34,02 %)	6 / 80 (7,50 %)	stille Mutation	ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4)	sub (Transition)
T14798C	66 / 241 (27,39 %)	3 / 80 (3,75 %)	stille Mutation	Cytb (Cytochrome b)	sub (Transition)
G1719A	2 / 241 (0,83 %)	5 / 80 (6,25 %)	stille Mutation	16S rRNA	sub (Transition)
C15904T	26 / 241 (10,79 %)	2 / 80 (2,50 %)	stille Mutation	tRNA-Thr (tRNA Threonin)	sub (Transition)
G709A	50 / 241 (20,75 %)	12 / 80 (15,00 %)	stille Mutation	12S rRNA	sub (Transition)

mtSNP	Austauschwahrscheinlichkeit Referenzgruppe 1 [CJO ⁺ 04]	Austauschwahrscheinlichkeit Referenzgruppe 2 [IK-PG00]	Art der Mutation	Locus	Art des Austausches
G12372A	28 / 241 (11,62 %)	8 / 80 (10,00 %)	mögl. Veränderung des Gehirns pH- Wertes [RMSM09]	ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5)	sub (Transition)
G3010A	78 / 241 (32,37 %)	13 / 80 (16,25 %)	stille Mutation	16S rRNA	sub (Transition)
C7028T	136 / 241 (56,43 %)	75 / 80 (93,75 %)	stille Mutation	CO1 (Cytochrome c oxidase subunit I)	sub (Transition)
G13708A	46 / 241 (19,09 %)	6 / 80 (7,50 %)	Marker für die mtHaplogruppe J [THF ⁺ 96], LHON-Risikofaktor [PSR ⁺ 11, BTRW95]	ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5)	sub (Transition)
C14766T	110 / 241 (45,64 %)	73 / 80 (91,25 %)	stille Mutation	Cytb (Cytochrome b)	sub (Transition)
G9055A	28 / 241 (11,62 %)	1 / 80 (1,25 %)	Parkinson-Schutzfaktor	ATP6 (ATP synthase F0 subunit 6)	sub (Transition)
T6365C	7 / 241 (2,90 %)	0 / 80 (0,00 %)	stille Mutation	CO1 (Cytochrome c oxidase subunit I)	sub (Transition)
A1811G	30 / 241 (12,45 %)	6 / 80 (7,50 %)	stille Mutation	16S rRNA	sub (Transition)
G8251A	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
T6776C	12 / 241 (4,98 %)	0 / 80 (0,00 %)	stille Mutation	CO1 (Cytochrome c oxidase subunit I)	sub (Transition)
G8697A	39 / 241 (16,18 %)	3 / 80 (3,75 %)	stille Mutation	ATP6 (ATP synthase F0 subunit 6)	sub (Transition)

Tabelle 1.1: **Ausgewähltes mtSNP-Set [BLN⁺05].**

Die dargestellte Tabelle beinhaltet die ausgewählten mtSNPs der drei Multiplexsysteme mit Informationen zur Mutation und Wildtyp der Position (Wildtyp sei der Position vorangestellt und die Mutation dahinter), zur Mutationsart, zum mitochondrialen Locus des jeweiligen mtSNPs sowie zu speziellen Austauschwahrscheinlichkeiten zweier Referenzgruppen. Referenzgruppen 1 [CJO⁺04] und 2 [BTRW95] beziehen sich auf Veröffentlichungen, bei denen das mitochondriale Genom unterschiedlich großer Personengruppen sequenziert wurde, aufgeführte mtSNPs untersucht und entsprechende Austauschwahrscheinlichkeiten annotiert wurden.

2 Zielstellung

Ziel der Forschungsarbeit ist die Etablierung mitochondrialer SNPs in der forensischen Molekulargenetik, um eine Alternative zur Analyse von stark degradiertem Untersuchungsmaterial mit STR-Systemen zu erhalten. Dabei sollen SNPs der mtDNA nachgewiesen und das methodische Potential der mtDNA ausgenutzt werden. Zusätzlich wird das mögliche Anwendungsspektrum der mtDNA in der forensischen Molekulargenetik und das Potential eingesetzter mtSNP-Systeme aus einem theoretischen Blickwinkel, vorgestellt. Nach Literaturrecherche [VJP04, BPP03] wurden 24 SNPs aus der kodierenden und nichtkodierenden Region der mtDNA ausgewählt. Als Untersuchungsmaterial dienen zum einen über einen Zeitraum von ca. 60 Jahren bodengelagerte Skelette, wobei je Individuum *craniale* und *postcraniale* Skelettabschnitte und verbliebenes Zahnmateriale untersucht werden. Für die Isolation der DNA aus dem Untersuchungsmaterial wird das Prinzip einer Phenol-Chloroform Methode angewandt. Dieses Verfahren soll dabei auf Effizienz und Sensitivität geprüft werden. Als Analyseverfahren wird die Minisequenzierung verwendet. Die Detektion der SNPs erfolgt mittels der Kapillarelektrophorese. Die Prüfung genannter Methoden erfolgt an problematisch zu untersuchendem Untersuchungsmaterial. Ferner sollen Multiplexverfahren zur mitochondrialen SNP-Analyse etabliert und optimiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Software

Die folgende Auflistung umfasst die erforderlichen Geräte und Software für die Arbeitspakete: Aufarbeitung- und Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials, Isolation der DNA aus den biologischen Material und mtSNP-Analyse.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zahn- u. Knochenmühle	MM200	Retsch, Düsseldorf
Autoklav	Autoklav23	Melag, Berlin
Hartschnittmikrotom	PolycutS	Reichert-Jung, Nussloch
Überkopfschüttler	neo-Lab-Rotator	neo-Lab, Heidelberg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424	eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Universal 320	Hettich, Weiterstadt
Wärmeschrank	Thermo SCIENTIFIC	HERAEUS
Wasser-/Schüttelbad	SW22	Julabo, Seelbach
Thermocycler	T3000	biometra, Goettingen
Thermocycler	GeneAmp® PCR-System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermoblock	TRIO-Thermoblock	biometra, Goettingen

Schüttler	VORTEX-GENE 2	Scientific Industries
Sequenziergerät	ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Feinwaage	CP2245	Sartorius
UV-Lampe	TA 150	Solimed-Quarzlampen, Markkleeberg
UV-Schrank	DNA/RNA UV-CLEANER UCV C/T-M-AR	Kisker, Steinfurt
Software		Firma
Datacollection Software ABI 310		Applied Biosystems, Weiterstadt
310 User Software (Analysesoftware ABI 310)		Applied Biosystems, Weiterstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Für eine optimale Durchführung der Methoden werden hier benötigte Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Pipetten	100-1000 μl , 10-100 μl 1-10 μl 0,1 -10 μl	eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (Dualfilter)	1000 μl , 100 μl , 0,1-10 μl	eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips	Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäße	50 ml Falcon TM	Sarstedt
Rundschalen	Milliporerundschalen ø47 mm	Millipore
Filtermembranen	MF TM . Membrane Filters, Filytertyp: 0,05 μm V MWP	Millipore
Glaswaren	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott Duran

3.1.3 Chemikalien und Verbrauchslösungen

Die benötigten Chemikalien, Verbrauchslösungen und Enzyme werden in diesem Abschnitt nach den entsprechenden Arbeitsschritten unterteilt.

Dekalzifizierung der Knochen und Zähne:

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller	Bestandteile
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure (EDTA)	Triplex® III (Ethylendinitrilo-tetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat)	MERCK	
Natriumhydroxid (NaOH)	NaOH-Pellets	MERCK	
Dithiothreitol	DTT	SERVA	
All-tissue DNA-Kit		GEN-IAL	
<i>Proteinase K</i>	EC 3.4.21.14, 100 mg Lyophilisat, 30 m Anson U/mg, c = 20 mg/ml	MERCK	

Quantifizierung von gDNA und mtDNA:

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller	Bestandteile
Quantifiler® Human DNA Quantification Kit		Applied Biosystems	
Bovine serum albumin (nicht acetyliert)	BSA	Sigma-Aldrich B8667	
TLE+		Ambion CatNo. 9520	0,1 mM EDTA, 20 µg/ml Linear Acrylamide, 10 mM Tris (pH 8.0)

DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform:

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller	Bestandteile
Phenol		ROTH	
Chloroform		MERCK	
Isoamylalkohol		MERCK	
Chloroform/Isoamylalkohol ((v/v) 24:1)		ROTH	
Tris(hydroxymethyl)- aminomethane (TRIS)	Tris 1M	SERVA	
Natriumchlorid (NaCl)	NaCl 5M	Kmf optiChem	
Chlorwasserstoff- säure	HCl	J.T. Baker	37 % - 38 %
Ethanol	EtOH	J.T. Baker	absolute (100 %)
TN-Puffer			10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM NaCl
TE-Puffer	Buffer AE (Elutionbuffer)	QIAGEN	10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (pH 9,0)

Überprüfung des Kontaminationsgrades der DNA-Isolate:

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller	Bestandteile
PowerPlex® S5 System		Promega	

mtSNP-Analyse:

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller	Bestandteile
Aqua dest.	Amplificationwater, grade = 1,250 μl	Promega	
Oligonukleotide	PCR, SNaPshot-Primer	BioTeZ Berlin- Buch GmbH (Biochemisch- Technologisches Zentrum)	
Multiplex-PCR-Kit		QIAGEN, Hilden	
SNaPshot® Multi- plexkit		Applied Biosys- tems	
Shrimp Alkaline Phosphatase	SAP 1 un/ μl	usb®	
Exonuclease I	EXO I 10 un/ μl	usb®	
Genescan™ - 120	LIZ™ Size Stan- dard	Applied Biosys- tems, Weiterstadt	
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosys- tems, Weiterstadt		
Matrix Standard Set DS-02	Matrix für die Auswertung auf ABI 310 Genetic Analyzer	Applied Biosys- tems, Weiterstadt	

3.1.4 Benötigte Oligonukleotide

Die benötigten Oligonukleotide für die Amplifikation der DNA-Abschnitte im Multiplexverfahren und der anschließenden SNaPshot-PCR wurden für jedes zu untersuchende System von der Firma Biotez bezogen. Entsprechende Sequenzen und Amplifikatlängen wurden aus den Literaturstellen [VJP04, BPP03] übernommen.

3.1.4.1 Multiplex-PCR-Primer

Alle Primer für die Multiplex-PCR hatten eine Ausgangskonzentration von 50 μM , welche jedoch in Vorversuchen für die Einstellung der Reaktionsbedingungen für eine Amplifikation von DNA-Abschnitten im Multiplexverfahren, neu abgestimmt wurden. Die Größe der Amplikate für alle drei Systeme lag zwischen 70 bp und 186 bp. Die folgende Tabelle (Tabelle 3.1) umfasst die Primersequenzen (Forward und Reverse) für die untersuchten mitochondrialen Positionen jedes Systems, die Länge der Primer sowie Amplikongrößen. Die Nomenklatur der Primer erfolgt nach den Vorgaben des *Armed Forces DNA Identification Laboratory* (AFDIL). Diese kennzeichnet die Position des 5'-Nukleotid für jeden Primer. Für die Multiplexreaktionen erfolgte eine Unterteilung der analysierten Positionen in drei 8-plex-Systeme. Zu erwähnen ist, dass die aus der Arbeit von Vallone et al. [VJP04] vorgestellte Position 14470 für die mtSNP-Analyse ausgeschlossen wurde, da schlechte bzw. keine Ergebnisse bei der Detektion erzielt wurden.

System	Bezeichnung	PCR-Primersequenz (5' - 3')	Länge
System 1	477-F	CTTTTGGCGGTATGCACTTT	20
	477-R	GGTGTGTGTGTGCTGGGTA	19
	4580-F	TCTTTGCAGGCACACTCATC	20
	4580-R	GCAGCTTCTGTGGAACGAG	19
	4793-F	CAACCGCATCCATAATCCTT	20
	4793-R	ATGTCAGAGGGGTGCCTTG	19
	5004-F	TCCATCATAGCAGGCAGTTG	20
	5004-R	TGGTTATGTTAGGGTTGTACGG	22
	7202-F	ACGCCAAAATCCATTTCACT	20
	7202-R	TTCATGTGGTGTATGCATCG	20
	10211-F	ACCACAACCTCAACGGCTACA	20
	10211-R	GGAGGGCAATTTCTAGATCAAA	22
	12858-F	ATGATACGCCCGAGCAGA	18
	12858-R	TGTGGGTCTCATGAGTTGGA	20
	16519-F	ACCACCATCCTCCGTGAAAT	20
	16519-R	AGACCTGTGATCCATCGTGA	20

System	Bezeichnung	PCR-Primersequenz (5' - 3')	Länge
System 2	709-F	TAGCTCTTAGTAAGATTACACATGCAAGCATCCC	34
	709-R	TGCTTGTCCCTTTTGTATCGTGGTGA	25
	1719-F	CTAAACCTAGCCCCAAACCCACTCCAC	27
	1719-R	CAGGTTTCAATTTCTATCGCCTATACTTTATTTGGGT	37
	3010-F	CGACCTCGATGTTGGATCAGGACA	24
	3010-R	CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	26
	11251-F	CAGCCAGAACGCCTGAACGCA	21
	11251-R	GAATGTTTAGTGAGCCTAGGGTGTGAGTGT	33
	14798-F	CCCCAATACGCAAAATTAACCCCCTAA	27
	14789-R	CGAAGTTTCATCATGCGGAGATGTTGG	27
	15904-F	CCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCC	32
	15904-R	AGGTTTTCATCTCCGGTTTACAAGACTGGTG	31
	12372-F	TGCAACTCCAAATAAAAGTAATAACCATGCACA	33
	12372-R	GGGTTAACGAGGGTGGTAAGGATGGG	26
	7028-F	GCAAACCTCATCACTAGACATCGTACTACACGACA	34
	7028-R	TGAAGCCTCCTATGATGGCAAATACAGC	28
System 3	1811-F	TGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACCGC	30
	1811-R	CATTATGCAGAAGGTATAGGGGTTAGTCCTTGC	33
	6365-F	CCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCT	28
	6365-R	TTGTTGTGATGAAATTGATGGCCCCTAA	28
	6776-F	GTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTTCCTAGGGT	34
	6776-R	CGGAGGTGAAATATGCTCGTGTGTCTACG	29
	8251-F	CCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAG	26
	8251-R	CTCTAGAGGGGGTAGAGGGGGTGCTATAGG	30
	8697-F	AACAACCGACTAATCACCACCCAACAATG	29
	8697-R	GAGATCAGGTTTCGTCCTTTAGTGTTGTGTATGG	33
	9055-F	CGTACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAG	29
	9055-R	AGTGTAGAGGGAAGGTTAATGGTTGATATTGCTA	34
	13708-F	ACCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCCACCCT	35
	13708-R	AAATCCTGCGAATAGGCTTCCGGCT	25
	14766-F	ATCGTTGTATTTCAACTACAAGAACACCAATGACC	35
	14766-R	GTGGGGAGGTTCGATGAGTGAGTGGTTA	27

Tabelle 3.1: **Verwendete Multiplex-PCR-Primer [VJP04, BPP03].**

Die Tabelle beinhaltet die eingesetzten Primersequenzen für die Amplifikation gewünschter mitochondrialer DNA-Abschnitte im Multiplexverfahren. Zusätzlich sind Informationen zur Länge spezifischer Primersequenzen beinhaltet. Die analysierten mitochondrialen Positionen wurden in drei 8-plex-Systeme unterteilt.

3.1.4.2 SNaPshot-PCR-Primer

Für die SNaPshot-PCR wurden die in Tabelle 3.2 beschriebenen Oligonukleotide eingesetzt. Die Orientierung der SNaPshot-Primer ist in Abhängigkeit der analysierten Position in Forward oder Reverse-Richtung angegeben. Die Synthese der Primer in Forward und Reverse-Orientierung zum untersuchten mtSNP war erforderlich, um Überschneidungen der Amplifikationsbereiche einzelner Marker zu vermeiden. Für eine optimale Detektion der mtSNPs wurden die Primer für das erste System in 5'-Orientierung um einen variablen Polythymidinanhang verlängert. Dies ermöglicht eine optimale Auftrennung unterschiedlich langer Fragmente. Die verwendeten Primer wurden mit einem Abstand von drei bis acht Nukleotiden designet. Der sequenzspezifische Teil bei System zwei und drei wurde um einen heterogenen sequenzunspezifischen Überhang $(gact)_n$ in 5'-Orientierung erweitert. Die hier verwendeten Primer wurden mit einem Abstand von zwei bis 16 Nukleotiden, unter Einbeziehung des sequenzunspezifischen Überhangs, erstellt.

System	Bezeichnung	SNaPshot-Primersequenz (5' - 3')	Länge
System 1	4793-R	(T) ₄ TCAGAAAGTGAAAGGGGGC	22
	10211-R	(T) ₁₀ ACTAAGAAGAATTTTATGGA	30
	5004-F	(T) ₁₄ AGACCCAGCTACGCAAAATC	34
	7202-F	(T) ₂₂ CCACAACACTTTCTCGGCCT	42
	16519-R	(T) ₂₄ TGTGGGCTATTTAGGCTTTATG	46
	12858-F	(T) ₂₇ GCAGCCATTCAAGCAATCCTATA	50
	4580-R	(T) ₂₉ TGGTTAGAACTGGAATAAAAGCTAG	54
	477-F	(T) ₃₈ CCCTCCCCTCCCTACTACTAC	58
	System 2 11251G-F	(gac) ₁ CTTCCCCTACTCATCGCACT	24
	14798-F	CCCCTAATAAAATTAATTAACCACTCA	27
	1719-F	<i>gac(gac)</i> ₂ CCACCTTACTACCAGACAACCTTA	35
	15904-R	<i>g(gact)</i> ₃ CCGGTTTACAAGACTGGTGTATTA	37
	709-R	<i>gac(gact)</i> ₅ TAGAGGGTGAACCTCACTGGAA	44
	12372-F	(gact) ₅ CACACTACTATAACCACCCTAACCCT	46
	3010-R	<i>ga(gact)</i> ₈ TTAATAGCGGCTGCACCAT	53
	7028-F	<i>gac(gact)</i> ₁₀ CTACACGACACGTACTACGTTGTAGC	69
System 3	13708-F	TAAACCCCATTAACCGCCTG	20
	14766-F	<i>ga</i> AATGACCCCAATACGCAAAA	22
	9055-F	<i>gac(gact)</i> ₁ ACTCATGCACCTAATTGGAAGC	29
	6365-F	(gact) ₂ CATCTTCTCCTTACACCTAGCAGG	32
	1811-F	(gact) ₄ GCAAGGGAAAGATGAAAAATTATA	40
	8251-R	(gact) ₆ GGGTGCTATAGGGTAAATACGGG	47
	6776-R	<i>ga(gact)</i> ₄ GTGTGTCTACGTCTATTCCTACTGTAAATAT	49
	8697-R	<i>gac(gact)</i> ₈ CGTCCTTTAGTGTTGTGTATGGTTAT	61

Tabelle 3.2: **Verwendete SNaPshot-PCR-Primer [VJP04, BPP03].**

Die Tabelle umfasst die verwendeten Primersequenzen für die SNaPshot-PCR analysierter mtSNPs für die drei 8-plex-Systeme. Die Längenangaben beziehen sowohl den sequenz-spezifischen als auch den- unspezifischen Teil der SNaPshot-Analyseprimer mit ein. Der sequenzunspezifische 5'-Überhang ist hier kursiv hervorgehoben.

3.1.5 Biologisches Untersuchungsmaterial

Für die Umsetzung der oben genannten Zielstellung wurden sowohl craniale und post-craniale Skelettabschnitte als auch das Zahnmaterial von ca. 60 Jahre bodengelagerten Skeletten aufbereitet. Der Umfang des zu untersuchenden biologischen Materials lag bei 22 Knochenfragmenten und 19 Zähnen. Das Untersuchungsmaterial wurde im Jahr 2002 während Straßenschachtarbeiten an der Justizvollzugsanstalt Chemnitz aufgefunden. Dabei konnten zum einen vier, weitgehend vollständige menschliche Skelette geborgen werden. Da keine systematischen Grabungen erfolgten, wurde zum weiteren Skelettmaterial mehrerer Individuen als separater Fund zur Untersuchung nachgereicht (bezeichnet als Fund 5). Eine Individualzuordnung dieser Skelettteile war zum Teil über autosomale und Y-chromosomale STR-Analysen im Rahmen von Voruntersuchungen möglich. Zur Analyse mitochondrialer SNPs, wurden Knochenfragmente von langen Röhrenknochen und platten Knochen des Skelettmaterials ausgewählt. Dabei fiel das Hauptaugenmerk auf die folgenden Regionen: *Cranium* (Schädel), *Calvarium* (Schädel ohne Unterkiefer), *Femur* (Oberschenkelknochen), *Tibia* (Schienbein) und *Humerus* (Oberarmknochen). Das Zahnmaterial umfasste sowohl Backenzähne, als auch Eckzähne aus Ober- und Unterkiefer der Skelette. Die folgende Tabelle legt das biologische Untersuchungsmaterial, unterteilt in die Skelettfunde, dar (Tabelle 3.3).

Fund	Knochenmaterial	Zahnmaterial
Fund 1	<i>Calvarium</i>	Uk Zahn
	<i>Humerus re.</i>	
	<i>Humerus re. zusätzlich</i>	
	<i>Femur re.</i>	
	<i>Femur li.</i>	
	<i>Femur li. zusätzlich</i>	
	<i>Tibia re.</i>	
Fund 2	<i>Calvaria</i>	Ok- und Uk-Zähne
	<i>Humerus re.</i>	
	<i>Femur re.</i>	
	<i>Tibia li.</i>	
	<i>Tibiaschaft li. zusätzlich</i>	
	<i>Tibia re.</i>	
Fund 3	<i>Calvaria</i>	∅
	<i>Humerus li.</i>	
	<i>Femur re.</i>	
	<i>Tibia li.</i>	
Fund 4	<i>Cranium</i>	Ok- und Uk-Zähne
	<i>Humerus li.</i>	
	<i>Femur li.</i>	
	<i>Tibia li.</i>	
	<i>Tibiafragment re. zusätzlich</i>	
Fund 5	∅	Ok- und Uk-Zähne

Tabelle 3.3: **Biologisches Untersuchungsmaterial.**

Die erste Spalte der Tabelle bezieht sich auf den untersuchten Fund. Bezeichnungen wie Fund 1 oder Fund 2 richten sich nach den Fundorten, bei denen das Skelettmaterial geborgen wurde. Die zweite Spalte kennzeichnet die untersuchten Knochenfragmente verschiedenerer knöcherner Strukturen. Überzählige Knochen wurden mit einem beigefügten „zusätzlich“ gekennzeichnet. Bezeichnungen wie re. und li. bezeichnen die jeweilige Körperseite. In der dritten Spalte ist, wenn vorhanden, das verwendete Zahnmaterial, aufgeführt. Abkürzungen wie Uk und Ok bezeichnen Unterkiefer und Oberkiefer.

3.1.5.1 Fundort und Beurteilung des Untersuchungsmaterials

Die Knochenteile waren überwiegend in einer lehmartigen Bodenschicht eingeschlossen und befanden sich einer Tiefe von ca. 40 cm bis 90 cm. Die Fundorte lagen teilweise nur wenige Meter auseinander. Jedoch waren die einzelnen Fundorte bzw. Funde eindeutig voneinander abzugrenzen. Die Spuren wurden im weiteren Verlauf entsprechend ihrer Beschaffenheit nach biologischen Spuren, botanischen- und Sachspuren zugeordnet. Weiterhin wurden die Skelettfunde nach dem Fundort und dem Datum des Auffindens unterteilt. Die am Fundort eins geborgenen biologischen Spuren (Fund 1) (siehe Tabelle 3.3) ließen sich zu einem fast vollständigen Skelett zusammensetzen (Abbildung 3.1). Das Becken, die langen Röhrenknochen und Teile des Schädels waren weitgehend erhalten geblieben. Ebenfalls ließ sich der Skelettfund vom Fundort zwei (Fund 2) zu einem nahezu vollständigem Skelett zusammensetzen, wobei sich zum Zeitpunkt ein linkes Schienbein diesem Fund nicht exakt zuordnen ließ. Die am Fundort drei aufgefundenen Skeletteile (Fund 3) konnten einem weiteren, wenn auch relativ unvollständigem, menschlichen Skelett zugeordnet werden. Auch am Fundort vier ließen sich die Skeletteile zu einem relativ vollständigen Skelett zuteilen. Die Zugehörigkeit überzähliger Skeletteile, die den beschriebenen Funden nicht sofort zugeordnet werden konnten, sollte durch DNA-Analysen näher bestimmt werden. Neben diesen relativ vollständigen Skelettfunden wurde Knochenmaterial gesichert, dass im wesentlichen durch fortgeschrittene Verrottung veränderte lange Röhrenknochen von mindestens vier Individuen umfasste (Fund 5). Zusätzlich fanden sich Fragmente von drei Schädeln, sechs Schulterblättern, fünf Oberarmknochen und acht Unterarmknochen.



Abbildung 3.1: **Skelettmaterial Fund1.**

Die Abbildung zeigt ein nahezu vollständiges Skelett, welches am Fundort 1 gesichert werden konnte. Dieser biologische Fund wurde unter den in der Fotografie sichtbaren Spurensicherungsnummern vermerkt.

Erste forensisch-osteologische Untersuchungen dienten der Liegezeitbestimmung, der Zuordnung nach der Art der Knochen (Mensch, Tier), der Anzahl der Individuen, dem Geschlecht sowie der Körperhöhenrekonstruktion und der Sterbealtersschätzung. Aus der Anzahl der Schädel und Schädeldächer war auf eine Mindestanzahl von insgesamt neun Individuen zu schließen. Das Geschlecht der Skeletteile wurde durch morphognostische Untersuchungen bestimmt. Hier kann eine sichere Bestimmung durch die Begutachtung der Beckenknochen vorgenommen werden. Ebenfalls kann die Beschaffenheit der langen Röhrenknochen zur Bestimmung des Geschlechtes herangezogen werden. Eine Altersschätzung erfolgte überwiegend über die Beurteilung des Obliterationsgrades der Schädelnähte, wobei hierbei die innere und äußere Knochentafel begutachtet wurde. Hinweise auf das Sterbealter lieferte mitunter der Zustand des Gebisses. Die Körperhöhe wurde mit Hilfe der Längenmaße der langen Röhrenknochen rekonstruiert. Bei der Beurteilung der Liegezeit wurde auf Methoden verzichtet, die eine Zerstörung des Knochenmaterials bewirken könnten. Für den Erhalt von Hinweisen über den Zeitraum der Bestattung, erfolgte eine Untersuchung der Knochenoberfläche. Dabei ist das Vorhandensein von Textilresten, Weichteil- bzw. Mumifikationsresten sowie Fettwachsresten von großer Bedeutung. Je nach Beschaffenheit des Bodens können Kleidungsreste von z.B. Friedhofsbestattungen bis zu einer Liegezeit von 30 Jahren gefunden werden. Bei gut konservierten Böden ist es möglich Kleidungsreste auch nach einer weitaus längeren Liegezeit vorzufinden. Lassen sich Weichteilreste bzw. deren Mumifikationsrelikte nachweisen, ist davon auszugehen, dass die Liegezeit des Knochenmaterials das erste Liegejahrzehnt nicht überschritten hat. Allerdings sind solche Befunde ebenfalls bei 70 % bis 90 % des zweiten Liegejahrzehnts und im Dritten Jahrzehnt bei 60 % bis 80 % noch möglich.

Fettwachsspuren an der Knochenoberfläche sind nach 20jähriger Lagerung in sandigen Böden nur noch mikroskopisch sichtbar, wobei Knochen, welche aus Löß und lößlehmartigen Böden gesichert wurden, sichtbare Fettwachsreste nach einer Liegezeit von 50 Jahren aufweisen können. Schäden im Sinne von Rissen der äußeren Kompaktschicht der Knochen können aller 20 Jahre Liegezeit in verschiedenen Ausprägungen und in Abhängigkeit der Umgebungsverhältnisse beobachtet werden. Auf Grundlage der erhobenen morphologischen Merkmale wurde die Liegezeit des biologischen Materials auf 30 bis 60 Jahre geschätzt, wobei jedoch eine Liegezeit von ca. 60 Jahren aufgrund von aufgefundenen Kleidungsresten (z. B. Knöpfe) und im Boden befindlicher Baumaterialien am wahrscheinlichsten ist.

3.2 Methoden

3.2.1 Probenpräparation und mechanische Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Für die anschließende mechanische Aufarbeitung des biologischen Untersuchungsmaterials musste dieses zunächst gründlich gereinigt und von möglichen Fremd-DNA-Anhaftungen befreit werden. Nach dem Heraustrennen und Abschleifen der Oberfläche (Abbildung 3.2) folgte die Reinigung der einzelnen Knochenfragmente mit 99 % Ethanol. Im Anschluss wurden die Fragmente von allen Seiten mit kurzwelligem ultraviolettem Licht für 30 min. bestrahlt. Durch die Behandlung mit UV-Licht wird die Struktur von anhaftender Fremd-DNA verändert, sodass diese später nicht mehr amplifiziert werden kann. Es schloss sich die mechanische Zerkleinerung der Knochenfragmente und Zähne (z.B. mit einer Kugelmühle oder einem Hartschnittmikrotom) zu feinem Knochen- bzw. Zahnmehl an. Die zum Einsatz kommende Menge an Knochenmaterial lag zwischen 3 g und 12 g. Das Gewicht der Zähne aus Ober- und Unterkiefer der einzelnen Funde, lag zwischen 0,8 g und 2,3 g. Für eine erfolgreiche Isolation von DNA aus länger gelagerten Knochen und Zähnen sollte ausreichend viel Knochen- und Zahnmehl verarbeitet werden.

Mengen über 200 mg bilden eine gute Voraussetzung für eine erfolgreiche DNA-Isolation mit einer hohen Ausbeute. In Relation von isolierbarer DNA-Menge je Milligramm eingesetztem Knochenmehl sollte in ausgewählten Fällen geprüft werden, ob z.B. der Feinbau der genannten Knochen Einfluss auf die Ausbeute an der gesamt- bzw. mtDNA haben kann.



Abbildung 3.2: **Vorbereitung der Knochenfragmente für eine anschließende Aufarbeitung.**

Die Abbildung zeigt vorbereitende Maßnahmen für die Aufarbeitung ausgewählter Knochenfragmente. In a.) wird die Entnahme eines 7,5 cm langen und 1,5 cm breiten Knochenfragmentes aus dem Diaphysen-Bereich der *Tibia* gezeigt. Das heraus getrennte Fragment wird in Abbildung b.) maßstabsgetreu gezeigt. Gerade bei Knochen mit einer längeren Bodenliegezeit ist die anatomische Struktur der Oberfläche durch äußere Einflüsse stark verändert. Um Verunreinigungen im Aufarbeitungsprozess zu vermeiden, musste die Knochenoberfläche abgeschliffen und gründlich gereinigt werden. Dabei musste allerdings auch ein Verlust der *Substantia compacta* berücksichtigt werden. Dies spielt gerade bei der Beurteilung der DNA-Ausbeute in Abhängigkeit des Knochenaufbaus eine wichtige Rolle. In Abbildung c.) ist die *Substantia compacta* vor und nach mechanischer Reinigung dargestellt.

3.2.2 DNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform

Die Isolation von DNA aus dem biologischen Untersuchungsmaterial erfolgte durch eine Kombination des *All-tissue DNA-Kit* der Firma GEN-IAL und einer Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform. Diese Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform wurde nach einem institutseigenen Protokoll durchgeführt, welches für gleichartige Fragestellungen, gerade für die Isolation von DNA aus besonders lang gelagertem und historischem Untersuchungsmaterial, verwendet werden kann. Das methodische Vorgehen wurde zunächst an Wangenschleimhautabstrichen von mehreren Probanden erprobt. Im Anschluss folgte die Isolation von DNA aus den Knochen- und Zahnlysaten der degradierten Knochenproben und einer rezenten Knochenreferenzprobe.

Der Erfolg einer forensischen DNA-Analyse hängt stark von der Qualität und der Quantität der DNA ab. Dies spielt dann eine besonders große Rolle, wenn die DNA der zu untersuchenden biologischen Spuren stark degradiert oder chemisch modifiziert ist, hervorgerufen durch ungünstige Umweltfaktoren und verschiedene chemische Prozesse.

Ebenfalls können substratabhängige Kofaktoren, bedingt durch die Herkunft der Probe, den Isolationsvorgang negativ beeinflussen. Vor diesem Hintergrund sollte gerade bei problematischem Skelettmaterial mit einer sehr langen Bodenliegezeit, eine effiziente und zugleich sensitive DNA-Isolationsmethode gewählt werden. Eine Methode, die sich insbesondere bei stark degradiertem biologischem Spurenmaterial und Proben bei denen PCR-Inhibitoren erwartet werden, bewährt hat, ist die Isolation von DNA mit Phenol-Chloroform. Im Vergleich mit anderen, konventionelleren DNA-Isolationsmethoden, wie der reinen Ethanol-fällung oder einer säulen-basierten Aufreinigung, sind die Ausbeuten an DNA relativ hoch und die DNA ist von hoher Qualität. Weiterhin ist das resultierende Isolat über einen längeren Zeitraum lagerungsfähig. Jedoch ist die Methode sehr zeit-aufwendig und der Einsatz von toxischen Substanzen (Phenol, Chloroform) erfordert entsprechende Vorsichtsmaßnahmen [KNP05].

Die organische Aufreinigung der DNA wurde mit den organischen Lösungsmitteln Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol durchgeführt. Die Methode beruht auf der Phasentrennung eines heterogenen Gemisches durch die Zugabe von Phenol und Chloroform. Infolge dieses Prozesses werden störenden Proteine denaturiert und reichern sich entsprechend durch hydrophile und hydrophobe Aminosäurereste in der Interphase des Phasengemisches an. Lipophile Substanzen, die später bei der PCR stören könnten, lagern sich in der unteren, lipophilen Phase an. Die DNA befindet sich in der wässrigen Phase [KNP05, HOMS⁺99]. Durch die Phenolextraktion wird das Enzym Proteinase K zerstört. Nach der Zugabe von Phenol erfolgt durch anschließende Zentrifugation eine Phasentrennung von lipophilen Substanzen, den Proteinen in der Zwischenphase und der wässrigen Phase mit der DNA. Phenolspuren und lipophile Substanzen werden anschließend durch Zugabe von Chloroform entfernt. Durch den Zusatz von Isoamylalkohol zum Chloroform wird ein Schäumen des Gemisches vermieden. Nukleinsäuren werden durch das Hinzugeben von absolutem Ethanol präzipitiert. Zugleich werden Chloroformreste durch die Zugabe von Ethanol entfernt [HOMS⁺99].

Zunächst wurde die Dekalzifizierung und Lyse der Zellen vorgenommen. Das Ziel der Dekalzifizierung des Knochen- und Zahnmehls ist die Entfernung von Ca-Ionen aus dem Hydroxylapatit des Knochen- und Zahnmaterials mit Hilfe des Chelatbildners Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Gerade bei Knochen mit einer hohen Bodenliegezeit ist eine lang andauernde Behandlung mit EDTA erforderlich. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines Calcium-EDTA-Komplexes, was zur Dekalzifizierung des Homogenisats führt und somit eine Freilegung der Zellen bewirkt. Für eine spätere Extraktion und Aufreinigung der DNA schließt sich der Dekalzifizierung die Lyse der Zellen an. Die Dekalzifizierung und die anschließende Lyse der Zellen wurden nach den Angaben des *All-tissue DNA-Kit* der Firma GEN-IAL durchgeführt. Das Kit ermöglicht die Aufbereitung und Extraktion von DNA aus verschiedenen Substraten. Durch eine dreitägige Behandlung mit einer 0,5 M EDTA-Lösung wurden störende Ca-Ionen schonend aus dem Hydroxylapatit des Knochen- und Zahnmaterials entfernt und die Zellen auf die anschließende Zelllyse vorbereitet. Hierfür wurde das zerkleinerte Knochen- und Zahnmaterial zunächst in 50 ml Falcons überführt, mit 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH

7,5) versetzt und bei 4 °C in einem Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 min bei 4000 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Die Zugabe von 40 ml, 0,5 M EDTA-Lösung und die anschließende Zentrifugation wurden 5-mal, über einen Zeitraum von drei Tagen, wiederholt (dreimal über Nacht und zweimal über Tag). Nach dieser dreitägigen EDTA-Behandlung wurde das Pellet mit 30 ml Aqua dest. versetzt, im Vortex gemischt und für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde 4-mal wiederholt. Die Zellen der Pellets wurden anschließend mit jeweils 1 ml Lyse 1-Puffer, 100 μ l Lyse 2-Puffer, 25 μ l DTT-Lösung (0,8 M) lysiert und 50 μ l Proteinase K denaturiert (Lyse 1-Puffer, Lyse 2-Puffer, Lyse 3-Puffer und das Enzym Proteinase K sind Komponenten des GEN-IAL Kits) [Gen] und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Es sollte darauf geachtet werden, dass die DTT-Lösung unmittelbar vor Zugabe hergestellt wird. Folgend wurde dem Gemisch jeweils 750 μ l Lyse 3-Puffer zugegeben und 20-30 Sekunden leicht gemischt. Vom entstandenen Lysat wurden jeweils 1 ml in Reaktionsgefäße (2 ml) überführt. Die Lagerung des Lysates erfolgte bei -20 °C. Der Dekalzifizierung und Zelllyse schloss sich die Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform an. Im ersten Schritt der Methodik wurde das erhaltene Knochen- und Zahnlysate mit 1 ml Phenol versetzt, 15 min auf dem Überkopfschüttler gemischt und anschließend bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der klare, evtl. leicht gelbliche Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der abgenommene Überstand wurde nun mit 0,5 ml Phenol und 0,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol ((v/v) 24:1) versetzt, 15 min auf dem Überkopfschüttler gemischt und folgend bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde wiederholt abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, erneut für 15 min auf dem Rotor vermengt und abschließend bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der hydrophile Überstand mit der DNA wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol für die Präzipitation der DNA und 40 μ l 5 M NaCl und eine Inkubation des Gemisches für 1 h bei -20 °C im Tiefkühlschrank. Anschließend an den Präzipitationsschritt folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm. Das Ethanol wurde dekantiert und verbleibende Ethanolreste vorsichtig abpipettiert. Das resultierende Pellet wurde im Anschluss bei 45 °C im Wärmeschrank oder einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA-Pellets wurden nachfolgend in jeweils 60 μ l TE-Puffer eluiert und Übernacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Dieser Puffer bewirkt eine Aufkonzentrierung der DNA und schützt das Molekül zugleich vor Degradation. Die Isolate wurden im nächsten Schritt kurz zentrifugiert (30 sec, 1000rpm). Daraufhin folgt ein Dialyseschritt für die Entfernung von störenden Salzen. Hierfür wurden Millipore-Rundschalen bis ca. zur Hälfte mit TN-Puffer gefüllt und Millipore-Membranen aufgelegt (glatte Seite nach oben). Die DNA-Isolate wurden auf den Membranen aus den Reaktionsgefäßen tropfenweise zusammengeführt (ca. 20 μ l Tropfen) und bei Raumtemperatur für 1 h bis 1,5 h inkubiert. Die aufgetragenen Tropfen wurden dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Tropfenstellen mit jeweils 5 μ l nachgespült und in dasselbe Reaktionsgefäß gegeben. Die Lagerung des Extraktes erfolgte bei -20 °C.

3.2.3 DNA-Quantifizierung

Eine quantitative DNA-Bestimmung erfolgte auf der einen Seite mit dem Ziel, Informationen über den Erhalt von genomischer DNA (gDNA) der DNA-Isolate aus dem Knochen- und Zahnmaterial, zu gewinnen. Auf der anderen Seite sollten die Menge an mitochondrialer DNA in den DNA-Isolaten exakt bestimmt werden, um die optimale Menge für eine anschließende Multiplex-PCR für die mtSNP-Analyse abzuschätzen. Als Methode wurde eine quantitative rt-PCR gewählt. Weiterhin sollten die Ergebnisse Aufschluss darüber geben, ob der Feinbau der untersuchten knöchernen Strukturen Einfluss auf die Menge extrahierbarer genomischer und mtDNA hat. Diese Resultate werden an späterer Stelle, im Ergebnisteil genauer diskutiert (siehe Kapitel Gegenüberstellung quantifizierter DNA aus dem biologischen Untersuchungsmaterial).

3.2.3.1 gDNA-Quantifizierung mittels qrt-PCR

Die Bestimmung vorhandener genomischer DNA aus den Extrakten mittels qrt-PCR bietet insbesondere für forensische Fragestellungen einige Vorteile. Ein Vorteil zeigt sich in der hohen Nachweissensitivität von Template-DNA, was insbesondere bei degradierten Proben bzw. bei biologischem Untersuchungsmaterial mit wesentlich geringer DNA-Menge, eine große Rolle spielt. Die Automatisierung dieser etablierten Methodik in modernen forensischen Analyselaboren, die daraus resultierende Zeitersparnis und einfache Handhabung unterstreichen weiterhin die Effizienz dieser Methodik gegenüber nicht-PCR-basierten Methoden. Zudem ist es mit nicht-PCR-basierten Methoden oftmals nicht möglich PCR-Inhibitoren oder auch DNA-Degradation zu erfassen [TSOB05].

Die Quantifizierung von genomischer DNA aus den Extrakten erfolgte nach den Angaben des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit von Applied Biosystems [AB]. Das Kit dient der Quantifizierung von genomischer DNA aus forensischen Proben und beruht auf dem Prinzip eines real-time PCR-basierten Assays. Neben den spezifischen Bestandteilen für die Bestimmung von genomischer DNA in der Probe beinhaltet das Kit interne Qualitätskontrollen (IPC) für die Überprüfung der Funktionalität einzelner Systembestandteile. Für die Quantifizierung wird hierbei auf eine „5'-Nuklease real-time“ Technologie zurückgegriffen [GRBH05]. Zum Einsatz kommen sowohl zwei targetspezifische PCR-Primer für die DNA-Amplifikation spezifischer Regionen als auch TaqMan® Sonden mit spezifisch markierten Fluorochromen (Reporter und Quencher-molekül). Zusätzlich zur 3'-Markierung ist die Sonde an diesem Ende durch ein MGB-Molekül chemisch modifiziert [AZK⁺97]. Durch diese Modifikation wird die Schmelztemperatur erhöht ohne eine Verlängerung der Sonde, was wiederum die Erstellung kürzerer Sonden begünstigt. Zu Beginn des Amplifikationsprozesses sind alle TaqMan-Sonden intakt, wobei die Reporterfluoreszenz durch das Quencher-molekül zunächst nach dem Prinzip des Förster-Resonanzenergie-Transfers unterdrückt wird. Zu Beginn des Synthesevor-

ganges hybridisiert die TaqMan MGB-Sonde spezifisch zur komplementären Template-DNA. Dieser Bereich der Hybridisierung wird durch zwei spezifische Primer begrenzt (Forward und Reverse). Der gesamte Amplifikationsprozess beruht weiterhin auf der 5'-3'-Exonucleaseaktivität der *hot-start DNA-Polymerase*, wodurch die TaqMan Sonde während des Synthesevorganges an der Template-DNA hydrolysiert wird. Der Abbau der Sonde führt dazu, dass sich Reporter und Quencher-molekül voneinander entfernen. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtstärke des Reportermoleküls gering, wird der Reporter aber durch die herannahende Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke.

Die nachfolgend aufgeführte Tabelle beinhaltet die Reaktionsbedingungen, unter denen die Quantifizierung durchgeführt wurde (Tabelle 3.4). Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems. Für die Auswertung der Ergebnisse steht dem Nutzer eine systemeigene SDS-Software zur Verfügung.

Komponente	Volumen/Reaktion
Quantifiler Primer-Mix	10,5 μ l
Quantifiler PCR-Reaktions-Mix	12,5 μ l
Probe/Standard/IPC	2 μ l

Tabelle 3.4: **Reaktionsansatz für die Quantifizierung von gDNA [AB].**

Die Reaktionsbedingungen wurden dem Standardprotokoll entnommen. Zu beachten ist, dass vor jeder Messung der eingesetzte Standard in entsprechenden Verdünnungen als Referenz vorbereitet werden sollte.

3.2.3.2 mtDNA-Quantifizierung mittels qrt-PCR

Um eine genaue Aussage über die Kopienzahl vorhandener mtDNA-Moleküle zu erlangen wurde ein Assay verwendet, welches die simultane Quantifizierung von genomischer und mitochondrialer DNA insbesondere aus forensisch-relevanten Proben, erlaubt [NKG⁺07]. Weiterhin wird es möglich Aussagen über den Grad der Degradation des DNA-Templates der Probe abzuleiten. Das Konzept basiert auf einem qrtPCR-TaqMan-Assay [AGA02]. Die Besonderheit des Assays besteht in der Verwendung targetspezifischer Plasmide, welche die IPC-Targetsequenzen genomischer und mitochondrialer Herkunft tragen. Das IPC-Plasmid dient hierbei als nichthomologes Target zur Inhibitionsdetektion. Als nukleäres Target dient die Genregion 2672 bp bis 2750 bp des Retinoblastoma Gens (RB1). Für das mitochondriale Target wurde eine Region mit wenig berichteten Polymorphismen ausgewählt. Dabei handelt es sich um die kodierende Region für tRNA-Lysine und der ATP-Synthase 8. Die zum Einsatz kommenden Sonden wurden für die Signaldetektion von gDNA bzw. mtDNA spezifisch markiert. Im RB1-wt-Target wurde eine der beiden Primerbindungsstellen in vitro mutagenisiert, wobei die Bindungsstelle des anderen Primers und der TaqMan-Sonde davon nicht beeinflusst wurden. Dieses mutagenisierte Produkt wurde kloniert, sequenzverifiziert und

als IPC-Target für die mtDNA-Quantifizierung verwendet. Bei der Detektion binden zum einen Primer und Sonde an das pRB1-IPC-Target und zum anderen hybridisieren mt-spezifische Primer und Sonde an die zu quantifizierende mtDNA in der Probe, wodurch zwei Signale detektiert und bewertet werden. Um die Qualität der mtDNA zu überprüfen werden zwei verschiedene Ansätze, die sich in resultierenden Amplikongrößen unterscheiden, angeboten.

Die Sequenzen der Primer und Sonden für die qrt-PCR sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 3.5).

Oligonukleotide	Sequenz 5'-3'
RB1 80 F	AGGTTGCTAACTATGAAACACTGGC
RB1 157 F ^a	CCAGAAAATAAATCAGATGGTATGTAACA
RB1 235 R ^a	TGGTTTAGGAGGGTTGCTTCC
RB1 235 IPC R	TCGTTTCGGAGCGTTGGTTAG
RB1 325 R	CCATCTCAGCTACTGGAAAACATTC
RB1 212 MGB	6FAM-CAGCACTTCTTTTGAGCAC-MGB
mt8154 F	GGGTATACTACGGTCAATGCTCTGA
mt8294 F ^a	CCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAAACC
mt8294 IPC F	CCAGTG TAGAGCTATGTTAGCATTTAGG
mt8395 R	GGGCCATACGGTAGTATTTAGTTGG
mt8436 R ^a	GTGATGAGGAATAGTGTAAGGAGTATGG
mt8557 R	CAATGAATGAAGCGAACAGATTTTC
mt8345 MGB	VIC-CCAACACCTCTTTACAGTGAA-MGB

Tabelle 3.5: **Primersequenzen und Sonden für das mitochondriale qrt-PCR-Assay [NKG⁺07].**

Die Tabelle zeigt benötigte Forward- und Reverseprimer, entsprechend ihrer genomischen oder mitochondrialen Spezifität. Die Sonden sind zusätzlich durch deren MGB-Modifikation, am 3'-Ende gekennzeichnet. Des Weiteren sind diese am 5'-Ende durch eine FAM- bzw. VIC-Markierung gelabelt. ^a der Literaturstelle [AGA02] entnommen.

Der Reaktionsansatz für die simultane Quantifizierung wurde nach den Angaben der Literaturstelle [NKG⁺07] vorbereitet (Tabelle 3.6). Das eingesetzte Reaktionsvolumen für das Assay betrug jeweils 20 μ l. Zur Überprüfung der Qualität an vorhandene mtDNA in der Probe, wurde zunächst der Ansatz für Amplifikate mit einer Mindestlänge von 143 bp durchgeführt. Je nach Resultat kann jedoch auf den Amplifikationsansatz für 283 bp Fragmentlängen zurückgegriffen werden. Vor der eigentlichen Quantifizierung von gDNA und mtDNA wurde eine Kalibrationskurve erstellt. Hierfür wurde ein Standard, bekannter Konzentration verwendet (pRB1-IPC-working stock solution, c = 5000 pDNAs/ μ l). Die Detektion erfolgte mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems. Die Amplifikation erfolgte in den folgenden Zyklen: 95 °C: 1 x 10 min, 95 °C: 40 x 15 sec, 60 °C: 40 x 1 min [NKG⁺07].

Komponente	Volumen/Reaktion
pre-Mastermix 142 bp	8 μ l
TaqMan Universal PCR Mastermix	10 μ l
Probe/H ₂ O	2 μ l
	20 μl rtqPCR-Reaktionsansatz

Tabelle 3.6: **qrt-PCR-Reaktionssatz für die Simultanquantifizierung von mtDNA und gDNA (143 bp-Ansatz) [NKG⁺07].**

Der pre-Mastermix für den 143 bp-Ansatz ist aus den mtPrimersequenzen, Primersequenzen für das genomische Target, den minor groove Binder (MGB) gelabelten Sonden für beide Biomoleküle, Bovine serum albumin (BSA) und dem Referenzplasmid, welches das genomische RB1-Target trägt, zusammengesetzt (BSA, mt8294F, mt8436R, RB1-157F, RB1-235R IPC, mt8345MGB-VIC, RB1MGB-NED, pRB1 IPC) (siehe Referenz [NKG⁺07]).

3.2.4 Überprüfung der Reinheit der DNA-Isolate

Für aussagekräftige mtSNP-Profile ist es wichtig, Informationen über eventuelle Verunreinigungen durch Fremd-DNA zu erhalten. Dabei ist darauf zu achten, dass Mischprofile, entstanden durch eine Kontamination von Fremd-DNA während des gesamten Aufarbeitungsprozesses, von einer möglichen Heteroplasmie der mtDNA-Varianten differenziert werden. Allerdings ist der Nachweis bzw. eine Zuordnung von DNA-Kontaminationen allein mit dem vorgestellten mtSNP-Set nicht möglich. Dies wird zum einen bedingt durch die begrenzte Anzahl an ausgewählten Positionen und der zum Teil geringen Austauschwahrscheinlichkeit einiger mtSNPs, die eine Diskrimination von Individualprofilen erschwert. Aus diesem Grund wurden die DNA-Isolate mithilfe polymorpher STR-Marker auf Reinheit überprüft. Hierfür wurde das PowerPlex® S5 Kit der Firma Promega, verwendet. Das Mini-STR-Kit erlaubt die Koamplifikation folgender STR-Marker: D18S51, D8S1179, TH01, FGA und Amelogenin. Die Angaben des Herstellers für die Amplifikation genannter STR-Systeme wurden optimiert (Tabelle 3.7). Die Amplifikationszyklen wurden für das schwer zu analysierende biologische Material im Hinblick auf den Erhalt optimaler STR-Profile variiert. Die Detektion der Fragmente erfolgte auf dem Sequenzer ABI PRISM® 310. Eine Analyse der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der GeneMapper® ID Software 2.0 [Pro]. Amplifizierte Proben wurden im Anschluss bei -20°C gelagert.

Komponente des Reaktionsansatzes	Volumen/Reaktion
Wasser (Amplifikationsgrad)	_ (auf das Reaktionsvolumen von 25 μ l anpassen)
PowerPlex® S5 Master Mix (5x)	5,0 μ l
PowerPlex® S5 Primer Pair Mix (10x)	2,5 μ l
Template-DNA (0,15 ng)	2 bis 17,5 μ l
	Reaktionsvolumen 25 μl

Tabelle 3.7: **Reaktionsansatz für die Amplifikation der PowerPlex® S5-Marker.**

Die Menge der Template-DNA wurde gegenüber den Angaben des Herstellers optimiert und entsprechend den Quantifizierungsergebnissen genomischer DNA, angepasst.

Die Amplifikation vorgestellter PowerPlex® S5-Marker erfolgte nach dem folgenden Amplifikationsprotokoll (Tabelle 3.8):

Amplifikationsprotokoll
96°C für 2 min
94°C für 30 sec
60°C für 2 min
72°C für 90 sec
für 30 Zyklen
60°C für 45 min 4°C abkühlen

Tabelle 3.8: **Amplifikationsbedingungen PowerPlex® S5.**

Die Anzahl der Zyklen bei der Amplifikation variierte zwischen 30 und 32 Zyklen, je nach eingesetzter Menge an Template-DNA. Eine Erhöhung der Zyklenzahl kann eine gesteigerte Nachweissensitivität beim Einsatz von sehr wenig Template-DNA, bewirken. Die Amplifikation wurde auf dem GeneAmp® PCR System 9700 durchgeführt.

3.2.5 mtSNP-Analyse

Die Analyse vorgestellter mtSNPs verfolgte das Prinzip eines allel-spezifischen Primer-Extension-Assays [SBC05]. Im ersten Schritt des Assays findet die Amplifikation spezifischer mtSNPs mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern statt. Für eine erleichterte Durchführbarkeit und Reproduktivität des Assays, sollte versucht werden, sowohl Amplifikationen als auch die Einzelbasenverlängerung in drei Multiplexreaktionen durchzuführen. Dies hat den positiven Nebeneffekt einer Zeit- und auch Kostenersparnis bei forensischen Fragestellungen [CS03]. Im Anschluss an die Amplifikation spezifischer mtDNA-Abschnitte folgt die Einzelbasenverlängerung (SBE), bei der unterschiedlich lange Oligonukleotidsequenzen spezifisch an die amplifizierte mtDNA-Abschnitte anlagern und durch die Verlängerung mit einem einzelnen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid verlängert werden. Unter Zuhilfenahme einzelner unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Nukleotide ist es möglich den positionsspezifischen Wildtyp von der in der Literatur beschriebenen Mutation, zu trennen. In diesem Sinne erfolgt die Beurteilung der Resultate anhand zweier Kriterien: Zum einen findet eine Unterscheidung ausgewählter mtSNP-Positionen anhand unterschiedlich langer amplifizierter mtDNA-Fragmente statt und zum anderen durch die Detektion unterschiedlich farbig markierter Nukleotide. Die Auftrennung und Detektion unterschiedlich langer, einzelsträngiger Fragmente erfolgte abschließend mittels Kapillarelektrophorese. Das nachfolgende Schema fasst das Vorgehen der mtSNP-Analyse mit den einzelnen erwähnten Schritten, zusammen (Abbildung 3.3).

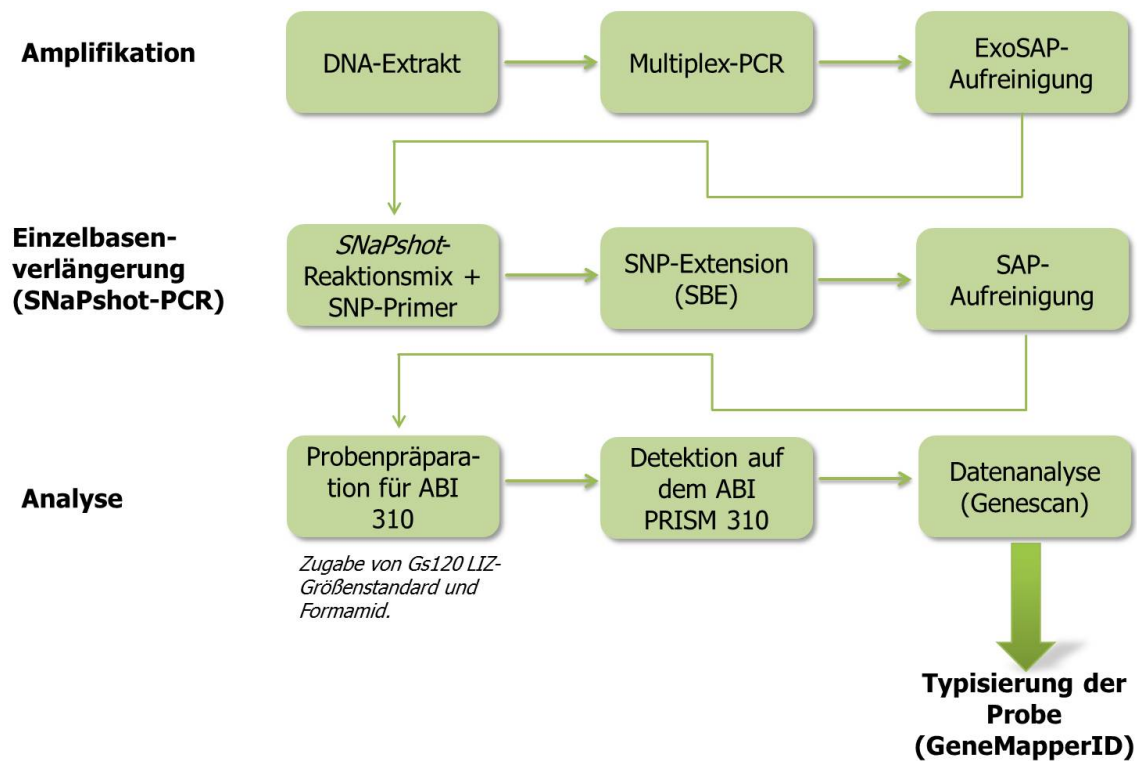


Abbildung 3.3: **Ablauf des Allel-spezifischen-Primerextension-Assays (mod. nach [But11]).**

Das abgebildete Schema fasst den Ablauf eines Allel-spezifischen-Primerextension-Assays, für die mtSNP-Analyse zusammen. Ausgehend vom isolierten DNA-Extrakt folgt die Multiplex-PCR spezifischer Positionen. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der Multiplex-PCR-Produkte durch die Behandlung mit den Enzymen Exo I und SAP. Das Enzym EXO I bewirkt den Abbau von sekundär amplifizierten Produkten. SAP dient zum Abbau von nicht eingebauten dNTPs. Dem enzymatischen Verdau schließt sich die Einzelbasenverlängerung in der SNaPshot-PCR an. Im Anschluss an die SNaPshot-PCR erfolgt ein erneuter enzymatischer Abbau von ungebundenen dNTPs mit SAP. Bevor die Proben auf dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer kapillarelektrophoretisch analysiert werden können, müssen der entsprechende Reaktionsmix durch die Zugabe eines Größenstandards (GS120 LIZ) und Formamid, vorbereitet werden. Nachdem die unterschiedlich langen und unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Fragmente kapillarelektrophoretisch aufgetrennt wurden, erfolgt die Analyse der Daten mit der GeneMapperID-Software.

3.2.5.1 Multiplex-PCR ausgewählter mtSNPs

Für die Amplifikation ausgewählter mitochondrialer Marker sowohl im Singleplex- als auch im Multiplexverfahren, wurde das QIAGEN Multiplex PCR Kit verwendet, wobei die Reaktionsbedingungen und das Amplifikationsprotokoll unerheblich verändert wurden. Spezielle Amplifikationsbedingungen der entsprechenden Literaturstellen aus denen die Systeme stammen, wurden jedoch nicht berücksichtigt. Alle Primer wurden zunächst in Singleplex-Ansätzen auf ihre Wirkungsweise und deren allelspezifischen Signale getestet. Weiterhin wurden die Primerkonzentrationen in Vorbetrachtungen aufeinander abgestimmt. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation spezifischer Positionen im Multiplexverfahren mit Hilfe der vorgestellten drei 8-plex-Systemen (siehe Abschnitt 1.9). Die benötigten Forward und Reverse-Primer für System 1 wurden mit der Software Primer 3 designt. Bei der Erstellung der Sequenzen wurde Wert darauf gelegt, dass im Hinblick auf das mögliche Vorliegen degradierter DNA die resultierenden Amplikone eine Größe von 200 bp nicht überschreiten. Primersequenzen der anderen beiden Systeme wurden mit dem Programm Primer Express erstellt. Die Primersets wurden in Vorbetrachtungen der Literaturstellen [VJP04, BPP03] jeweils auf Selbsthybridisierung, mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Oligonukleotiden und die Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie etwa hairpins oder Primer-Dimer-Strukturen geprüft.

Die Ansätze für alle drei Multiplexsysteme erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 13 μl (Tabelle 3.9).

Komponente	Volumen/Reaktion
Multiplex-PCR Mastermix	6,25 μl
Primer	je 0,2 ^a μl
Aqua dest.	_ (auf das Reaktionsvolumen von 13 μl anpassen)
mtDNA (58493 mtGE o. 0,4678 fg/ μl)	max 3,55 μl

Tabelle 3.9: **Multiplex-PCR-Reaktionsansatz.**

Die Angaben für den Reaktionsansatz wurden für jedes der drei 8-plex-Systeme verwendet.

^a Das eingesetzte Volumen von 0,2 μl bezieht sich auf jeden F/R-Primer jedes Systems. Für ein standardisiertes Protokoll wurde versucht, eine gleichbleibende mtDNA-Kopienzahl der Proben in der Multiplex-PCR einzusetzen. Das max. Volumen in diesem Amplifikations-schritt beträgt 3,55 μl .

Die Amplifikationsbedingungen weichen an einigen Stellen von den Angaben des Herstellers QIAGEN® ab (Tabelle 3.10). So wurde eine Annealingtemperatur von 64 °C gewählt. Die Finale Extension verlief bei einer Temperatur von 60 °C. Die Amplifikation wurde auf dem GeneAmp® PCR System 9700 durchgeführt.

Amplifikationsprotokoll

95°C für 15 min - Initiale Denaturierung

94°C für 30 sec - Denaturierung

64°C für 50 sec - Primerannealing

72°C für 40 sec - Extension

für 30 Zyklen

60°C für 20 min - Finale Extension

8°C abkühlen

Tabelle 3.10: **Amplifikationsbedingungen Multiplex-PCR.**

3.2.5.2 Enzymatische Aufreinigung

Im Anschluss an die Amplifikation spezifischer Positionen folgte eine enzymatische Aufreinigung des Ansatzes mittels EXO I und SAP. Das Enzym SAP katalysiert die Dephosphorylierung ungebundener dNTPs, die in der folgenden SNaPshot-PCR stören würden. Hingegen bewirkt EXO I die Spaltung übriger Primer im Ansatz. Für den Verdau wurde dem Ansatz aus der Singleplex bzw. Multiplexreaktion jeweils 0,4 µl EXO I und 1 µl SAP hinzugegeben. Anschließend erfolgte der Verdau bei 37 °C für 1 Stunde. Daraufhin wurden die Enzyme bei 75 °C für 15 Minuten inaktiviert. Die Inkubation des Ansatzes fand auch hier auf dem GeneAmp® PCR System 9700 statt.

3.2.5.3 Minisequenzierung mittels SNaPshot-PCR

Die Einzelbasenverlängerung oder Minisequenzierung wurde mit dem SNaPshot-PCR Multiplex Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Entsprechend den Literaturstellen [VJP04, BPP03] wurden die Analyse-Primer für die SNaPshot-PCR ebenfalls auf Selbsthybridisierung, Kreuzreaktionen und die Ausbildung von Sekundärstrukturen getestet. Bevor eine exakte Analyse ausgewählter Positionen erfolgte, mussten die Primerkonzentrationen in Vorversuchen erheblich angepasst und verändert werden, um exakte und einwandfreie mtSNP-Profiles bei der Auswertung verfügbar zu haben. Das Reaktionsvolumen wurde auf 10 µl für jeden Ansatz festgelegt. Je nach Resultat und Eindeutigkeit des mtSNP-Profiles ist es möglich PCR-Produkte aus der Multiplexreaktion in einem Volumenintervall von 0,5 µl bis 1 µl einzusetzen. Für die Trennung alle-spezifischer Signale aus der Einzelbasenverlängerung, wurden eingesetzte ddNTPs im Reaktionsmix der Firma Applied Biosystems mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-

fen markiert (Tabelle 3.11). Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt zusätzlich einen anderen Emissionsbereich, wodurch die Intensität einzelner Peaks variabel ist.

ddNTP	Fluoreszenzfarbstoff	Signalfarbe
A	dR6G	Grün
C	dTAMRA TM	Schwarz
G	dR110	Blau
T (U)	dROX TM	Rot

Tabelle 3.11: **Fluoreszenzmarkierung eingesetzter ddNTPs.**

Aufgeführt sind die Fluoreszenzmarkierungen eingesetzter ddNTPs für die SNaPshot-PCR und die Farbe des Nukleotides, wie es im Elektropherogramm dargestellt wird.

Analog zur Multiplex-PCR wurde der Reaktionsansatz leicht modifiziert und optimiert. Das Reaktionsvolumen von 10 μ l je Ansatz wurde beibehalten (Tabelle 3.12).

Komponente	Volumen/Reaktion
SNaPshot Multiplex Mix	3 μ l
Primer	je 0,4 ^a μ l
Aqua dest.	– (auf das Reaktionsvolumen von 10 μ l anpassen)
Multiplex-PCR-Produkt	0,5 μ l - 1 μ l

Tabelle 3.12: **SNaPshot-PCR-Reaktionsansatz.**

Die Angaben für den Reaktionsansatz wurden für jedes der drei 8-plex-Systeme verwendet. ^a Das eingesetzte Volumen von 0,4 μ l bezieht sich auf jeden F/R-Primer jedes Systems. Die eingesetzten Volumina an SNaPshot Multiplex Mix und Primer wurden beibehalten.

Die Amplifikationsbedingungen wurden nicht verändert und aus dem Kit übernommen (Tabelle 3.13).

Amplifikationsprotokoll
96 °C für 10 sec
50 °C für 5 sec
60 °C für 30 sec
für 25 Zyklen 4 °C abkühlen

Tabelle 3.13: **Amplifikationsbedingungen SNaPshot-PCR.**

Um ungebundene ddNTPs zu entfernen wurde anschließend an die SNaPshot-PCR zu jedem Ansatz jeweils 0,4 μ l SAP hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 Stunde. Es folgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 15 Minuten. Sowohl die SNaPshot-PCR als auch der anschließende enzymatische Verdau des Ansatzes erfolgte auf dem GeneAmp® PCR System 9700.

3.2.5.4 Detektion mitochondrialer SNPs mittels Kapillarelektrophorese

Die Fragmentlängenanalyse fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide erfolgte durch Kapillarelektrophorese auf dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Hierfür wurden die Proben wie folgt vorbereitet (Tabelle 3.14).

Komponente	Volumen/Reaktion
Hi-Di TM Formamid	9 μ l
GeneScan TM 120 LIZ [®] Längenstandard	je 0,5 μ l
SNaPshot-PCR-Produkt	0,5 μ l

Tabelle 3.14: **Probenvorbereitung ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.**

Die Proben wurden bei 95 °C für 3 Minuten denaturiert. In Kombination mit der Zugabe des Formamids bewirkt der Denaturierungsschritt ein andauerndes Vorliegen von einzelsträngigen Oligonukleotidfragmenten, die kapillarelektrophoretisch detektiert werden können. Die Umgebungsbedingungen für den Lauf wurden leicht abgeändert (Tabelle 3.15).

Laufbedingung	Beschreibung
Modulfile	GS STR POP4 (1ml) E5.md5
Matrixfile	none
Injektionszeit	5 sec
Injektion (kV)	15 sec
Lauf (kV)	15
Lauftemperatur	60 °C
Laufzeit	15 min

Tabelle 3.15: **Umgebungsbedingungen für den Lauf.**

Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit Hilfe der Software GeneMapper[®] ID Software Version 2.0. Als Unterstützung für eine exakte Beschreibung einzelner Peaks wurden auf die mtSNP-Systeme zugeschnittene Panels geschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Erzielte gesamtDNA-Ausbeuten mittels Phenol-Chloroform Isolation

Ein Teil der Zielstellung für die vorliegende Arbeit beinhaltete die Isolation von gDNA und mtDNA mit Hilfe des GEN-IAL Kits und einer anschließenden DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform, aus Knochen- und Zahnmaterial mit einer langen Bodenliegezeit. Für den Isolationsvorgang stand aufgearbeitetes Knochenmaterial im Bereich von 0,79 bis 3,72 g zur Verfügung. Das mechanisch aufbereitete Zahnmehl lag zwischen 2,21 g und 5,14 g. Einzelne Zähne wurden für die Isolation gepooled, d.h. gemahlenes Zahnmaterial von Oberkieferzähnen und Unterkieferzähnen wurden fundspezifisch zusammengeführt. Das methodische Vorgehen der Phenol-Chloroform Aufreinigung der DNA wurde zunächst an rezentem Knochenmaterial erprobt. Hierbei ergab sich eine gDNA-Ausbeute von $123,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Mit Hilfe der angewandten Phenol-Chloroform Aufreinigung der DNA konnten gesamtDNA-Ausbeuten für die zu untersuchenden Knochenfragmente zwischen $0,002 \text{ ng}/\mu\text{l}$ und $0,089 \text{ ng}/\mu\text{l}$ erreicht werden. Bei Knochenmaterial aus drei aufgearbeiteten Knochenregionen (*Cranium* (Fund2), *Humerus* li. (Fund 4), *Tibia* zusätzlich (Fund 4)) war es nicht möglich gDNA zu quantifizieren. Für das zusammengeführte Zahnmaterial ergaben sich gDNA-Ausbeuten im Bereich von $0,008 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bis $0,35 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

4.2 Etablierung des qrt-Pcr-Assays für eine mtDNA-Quantifizierung

Mit Hilfe der simultanen Quantifizierung von mtDNA und gDNA durch ein modifiziertes TaqMan-Assay, konnte die Kopienzahl an vorhandenen mtDNA-Molekülen aus allen DNA-Isolaten bestimmt werden. Dabei wurden äquivalente Quantifizierungsergebnisse an gDNA zunächst nicht explizit beurteilt. Unter Berücksichtigung einer möglichen Degradation der mtDNA durch die Lagerungsbedingungen des Untersuchungsmaterials wurde der Ansatz für eine Amplifikation von mtDNA-Fragmenten mit einer Amplifikatlänge von mindestens 143 bp gewählt. Somit wird es möglich, neben einer Quantifizierung von mtDNA, die Qualität des mtDNA-Templates zu überprüfen. Die genaue Kopienzahl an mtDNA-Molekülen (mtGE) konnten nur durch Einbeziehung einer statistischen Analyse bestimmt werden. Mit Hilfe einer linearen Regression, war es möglich die Abhängigkeit zwischen den Variablen Ct-Wert und mtGE in der Probe darzustellen. Ein ermittelter Ct-Wert eines mtDNA-Standards zum Zeitpunkt t wurde in diesem System als abhängige Variable bzw. Regressand betrachtet (Abbildung 4.1). Als Regressor oder

unabhängige Variable diene die Anzahl vorhandener mtDNA-Moleküle eines mtDNA-Standards. Durch gemessene Ct-Werte während des Amplifikationsvorganges, konnte durch Variation der Regressionsfunktion die Variable: „mtDNA-Kopienzahl“ in der Probe bestimmt werden. Grundlage für die Berechnung der Regressionsgeraden war die Darstellung einer Standardkurve für das mtDNA- und gDNA-Template (IPC).

Mit Hilfe dieser statistischen Analyse wurden tatsächliche mtDNA-Kopienzahlen aus den Proben in einem Intervall von 203 mtGE und 463339 mtGE ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede an vorliegenden mtDNA-Kopienzahlen zwischen den untersuchten knöchernen Strukturen und Zähnen, festgestellt werden. Die höchste Anzahl an mtDNA-Molekülen wurde aus der Region *Femur* eines Fundes ermittelt. Durch eine Gegenüberstellung ermittelter Werte mit dem entsprechenden genomischen Äquivalent können errechnete mtDNA-Kopienzahlen gleichermaßen durch eine Mengenangabe ausgedrückt werden. Die Masse eines mitochondrialen Genoms (dsDNA) beträgt $1,699586 \times 10^{-8}$ ng. Unter der Annahme, dass alle mtGenome vollständig sind, können ermittelte mtGE-Werte (1 mtGE = 2 template Moleküle für die PCR) einfach mit diesem Wert multipliziert werden. Aus Sicht der downstream Applikation ist dies jedoch nicht unbedingt praktikabel, da hier die Anzahl der Templatemoleküle wesentlich informativer ist. Auch in Bezug auf die Analyse von aDNA ist die Anzahl der Template-moleküle leichter zu interpretieren.

Die Steigung der ermittelten Regressionsgeraden liegt bei

$$E = 10^{(-1/slope)} = 10^{(1/3,6273)}$$

Die Steigung beschreibt eine 1,8866 fache Produktmenge in Zyklus n+1 relativ zu Zyklus n bzw. eine apparente Einzelzyklus PCR Effizienz von 88,66%. Die Ct-Werte der internen genomischen Kontrolle (IPC), in Form eines genomischen Templates, stiegen mit zunehmendem mtDNA Input an. Dies ist wahrscheinlich nicht das Ergebnis eines PCR Inhibitors in der Standard DNA sondern eher eine kompetitive Hemmung, die durch Erhöhung der pRB1 (IPC) Einsatzmenge in die Reaktion vermieden werden könnte. Das Bestimmtheitsmaß oder der Korrelationskoeffizient R^2 beträgt 0,9939. Der Korrelationskoeffizient liegt nahe 1, was einen direkten proportionalen Zusammenhang zwischen dem Regressand „Ct-Wert“ und dem Regressor „mtGE“-Standard beweist.

Standardkalibrationskurven: mtDNA-Quantifizierung

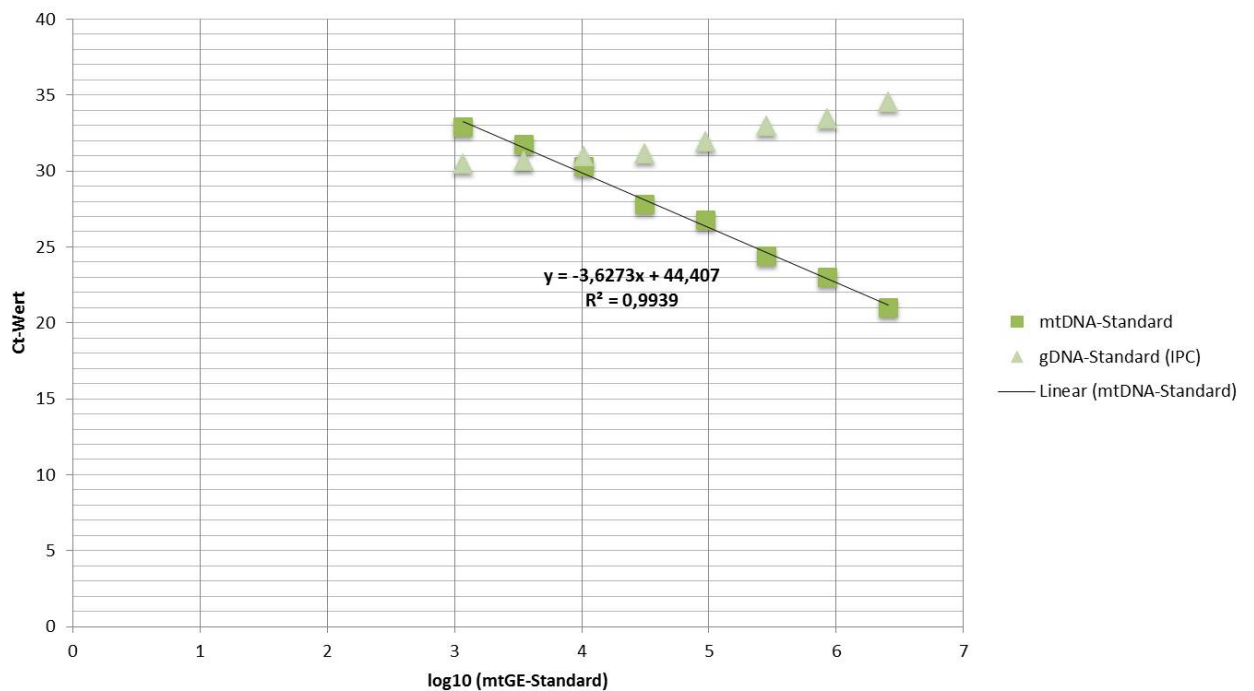


Abbildung 4.1: **Bestimmung der Regressionsfunktion.**

Das Diagramm zeigt die ermittelten Standardkurven für das mtDNA-Template und die interne genomische Kontrolle (IPC). Die entsprechenden Ct-Werte der Standards wurden einer vorhergehenden beispielhaften Kalibration entnommen. Die Regressionsgerade der Kalibrationskurve des mtDNA-Standards ist im Diagramm dargestellt. Diese dient der Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl, in Abhängigkeit des Ct-Wertes. R^2 bezeichnet den Korrelationskoeffizienten oder das Bestimmtheitsmaß der Funktion und erklärt die Abhängigkeit der Variablen Ct-Wert und log10 (mtGE) voneinander.

4.3 Kontaminationsgrad der DNA-Isolate

Der Grad einer möglichen Kontamination wurde unter der Annahme, dass Kern-DNA in einem geringfügigen Maße im Untersuchungsmaterial vorliegt, bestimmt. Die Interpretation der mtSNP-Profile sollte durch das Vorliegen reiner DNA-Isolate, frei von Kontaminationen, erleichtert werden. Dazu sollte der Aufbereitungsverlauf, von der mechanischen Aufbereitung bis hin zur DNA-Isolation, auf die Einhaltung von Reinheitsbedingungen überprüft werden. Für das Screening fand das MiniSTR-Kit PowerPlex® S5 Anwendung. Mit diesem Kit werden vier verschiedene Genloci bzw. STR-Systeme (D18S51, D8S1179, TH01, FGA) und der geschlechterspezifisierende STR-Marker Amelogenin für eine Typisierung der Proben koamplifiziert und analysiert.

Unter den angegebenen Standardbedingungen für die Prä- und Postamplifikation spezifischer Loci, war es möglich den Kontaminationsgrad der DNA-Isolate des Untersuchungsmaterials zu überprüfen. Dabei zeigte sich eine hohe Diversität zwischen den STR-Profilen. Dadurch ließen sich mehrere Individuen eindeutig typisieren. Alle STR-Profile der Knochen- und Zahnisolate waren eindeutig zu typisieren und zeigten keine Anzeichen einer möglichen Kontamination durch Fremd-DNA. Die STR-Systeme konnten unter der eingesetzten DNA-Menge von $0,15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ausreichend gut amplifiziert werden. Die Zyklenzahl bei der Amplifikation variierte zwischen 30 und 32 Zyklen. Unter der Berücksichtigung einer möglichen Degradation der Template-DNA zeigten sich größtenteils eindeutigere Ergebnisse mit 32 Zyklen. In Ausnahmefällen traten Artefakte wie Stutterpeaks, Farbdurchschläge oder Phänomene wie drop-in oder drop-out bestimmter Allele auf (Abbildung 4.2). Diese hinderten eine eindeutige Zuordnung der Allele jedoch kaum. Die Fragmentgrößen für die fünf Systeme reichen von 86 bis 260 bp [Pro]. Amplifikationen von Abschnitten über 200 bp erwiesen sich bei vorliegender Template DNA in einigen Systemen als schwierig. Bei den Systemen FGA und D8S1179, ließen sich drop-outs vermuten, was durch eine mögliche Degradierung der Template-DNA zu begründen ist (Abbildung 4.3).

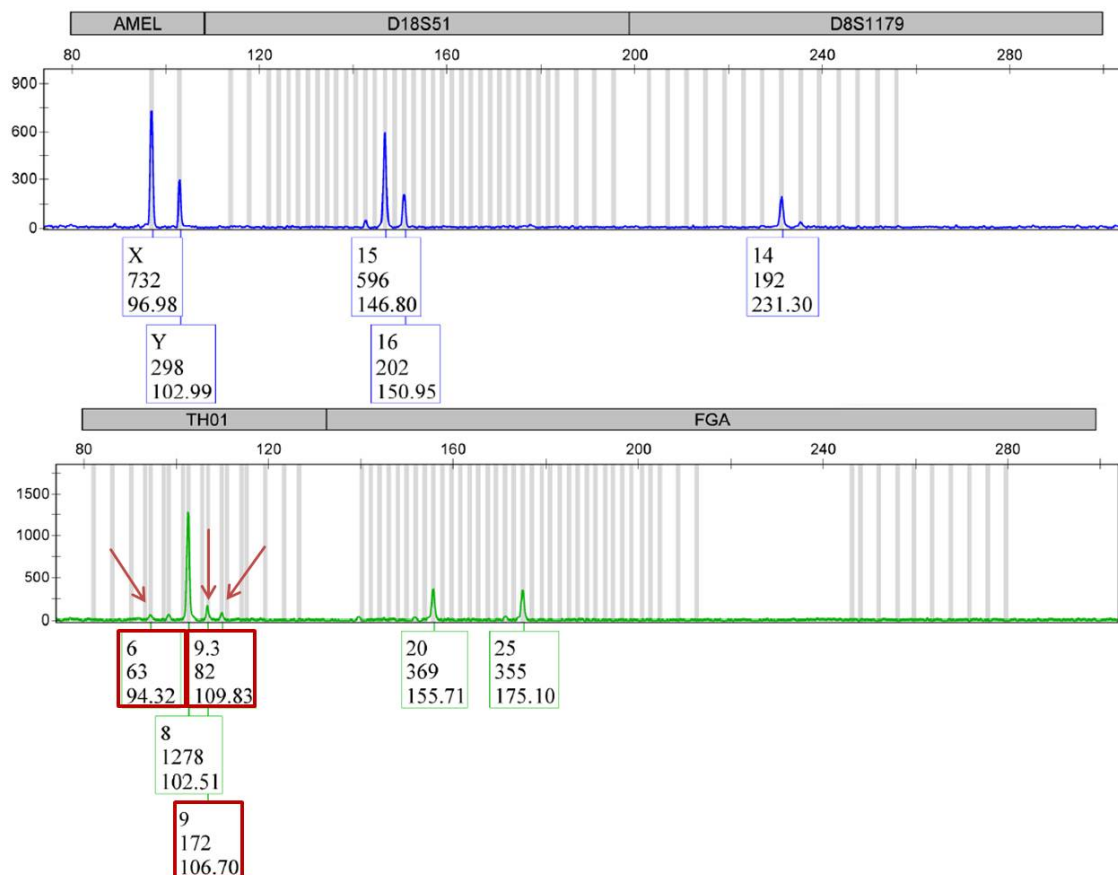


Abbildung 4.2: **STR-Profil (Tibia, Fund 3).**

Dargestellt ist das PowerPlex® S5-Profil eines *Tibia*-Knochenfragmentes des Fundes 3. Die Amplifikation aller fünf Systeme wurde unter den im Methodenteil aufgeführten Standardbedingungen durchgeführt. Die Peakhöhen liegen zwischen 100 RFU und 1200 RFU. Die Voreinstellungen der Analyse-Software wurden so gewählt, dass Peaks unter 50 RFU nicht markiert wurden. Eine Imbalance heterozygoter Peaks lässt sich im System D18S51 erkennen. Stutterpeaks vor und nach dem Hauptpeak sind mit roten Pfeilen markiert. Es handelt sich hier um ein männliches Individuum. Dies wird durch die Ausprägung eines X- und Y-Allels im System Amelogenin deutlich.

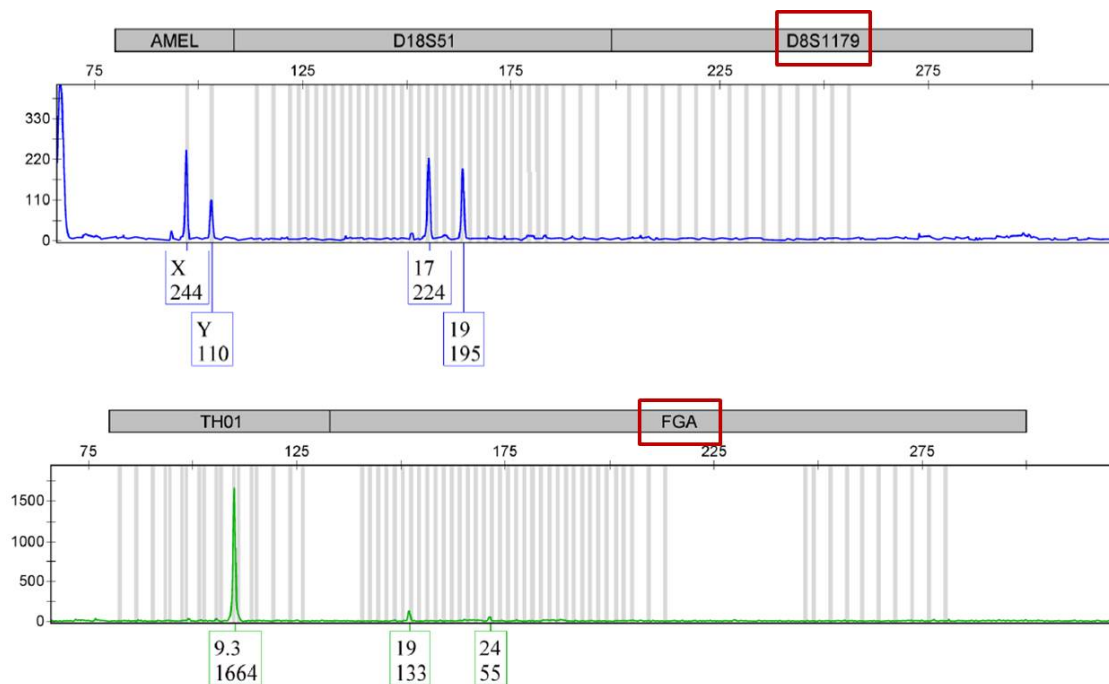


Abbildung 4.3: **STR-Profil degradierter DNA (*Cranium*, (Fund 1)).**

Als Beispiel für ein STR-Profil degradierter Template-DNA, dient die folgende Abbildung. Das Profil eines *Cranium*-Fragmentes (Fund 1) zeigt ein locus drop-out im System D8S1179. Ebenfalls sind die Signalstärken im System FGA nur sehr gering (55 - 133 RFU). Es wurden lediglich Fragmente bis zu einer max. Länge von 175 bp amplifiziert. Die Höhe der Peaks lassen ebenfalls eine Degradation vermuten bzw. eine schlechte Qualität der DNA. Das dargestellte Ergebnis konnte in einer anschließenden Amplifikation mit 32 Zyklen deutlich verbessert werden.

4.4 Einfluss des Knochenfeinbaus auf die gDNA- und mtDNA-Ausbeute

Ein weiterer Bestandteil der Forschungsarbeit schloss eine allgemeine Abschätzung über dem Einfluss des Feinbaues untersuchter, biologischer Strukturen auf die Isolationsausbeuten genomischer- und mitochondrialer DNA ein. Für die Beurteilung des Feinbaus, waren ermittelte quantifizierte gDNA- und mtDNA-Mengen untersuchter Knochenfragmente und Zähne maßgeblich. Innerhalb dieser Analyse wurden die Quantifizierungsergebnisse der gDNA und mtDNA voneinander getrennt betrachtet und bewertet. In Verbindung mit diesen Ergebnisse sollte die Hypothese von MacHugh et al. [MEB⁺00] überprüft werden. So sollen kompakte Knochen mit einem komplexen *compacta*-Anteils aufgrund ihrer geringeren Kontaminationsanfälligkeit durch Bakterien und Pilze geeigneter für DNA-Untersuchungen sein, als Knochen mit einem erhöhten spongiösen Anteil (Abbildung 4.4). Eine Überprüfung dieser Hypothese fand durch Interpretation der Quantifizierungsergebnisse und unter Einbeziehung der Stärke des *Compacta*anteils ausgewählter Knochenfragmente statt.

Dabei spielt das Wissen über den Zustand der Knochen und Zähne vor dessen Reinigung und mechanischen Zerkleinerung, eine wichtige Rolle. Faktoren wie eine fortschreitende Fäulnis oder andere Verrottungserscheinungen, sowie Lagerungsumgebungen können die Qualität des Materials stark beeinflussen.

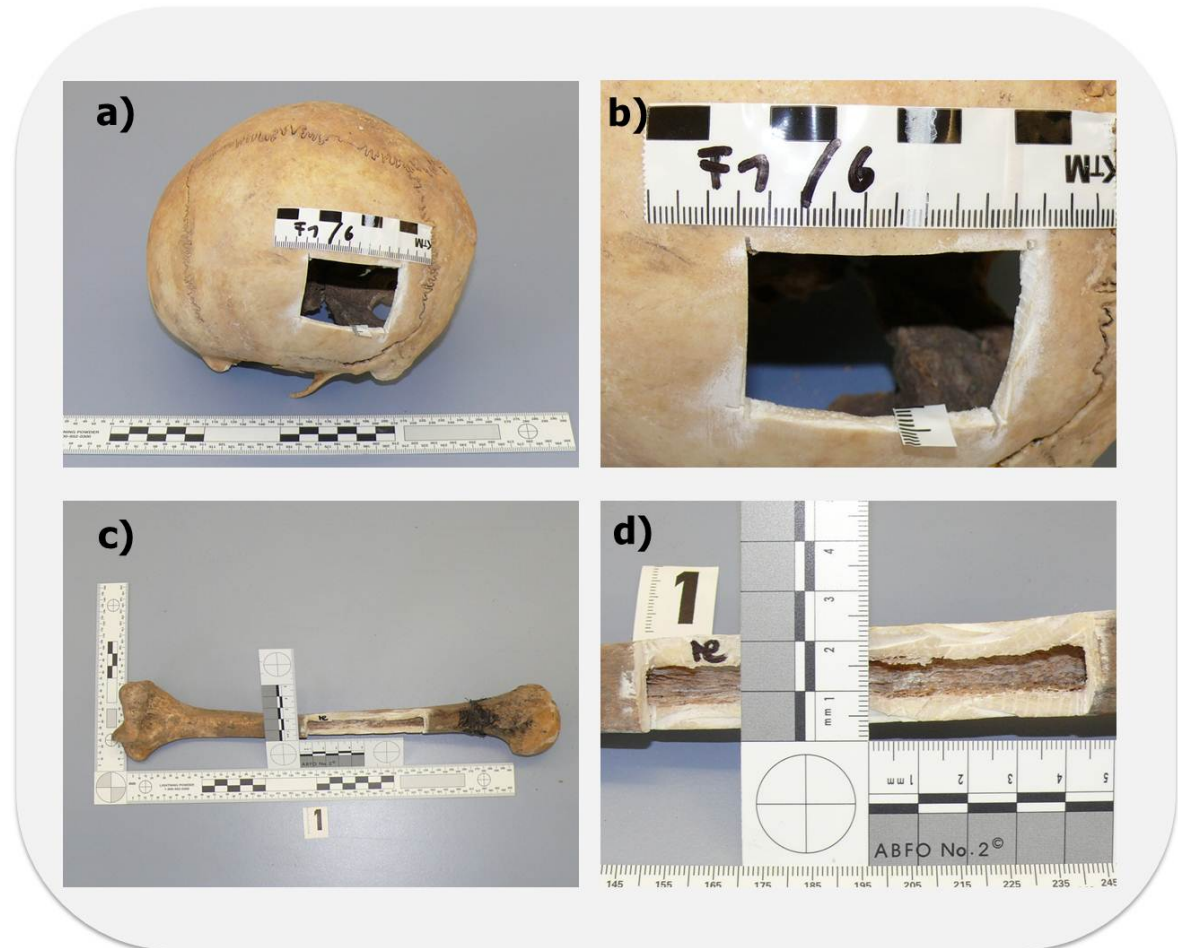


Abbildung 4.4: **Gegenüberstellung des Knochenfeinbaus von *Cranium* und *Humerus* (Fund 1).**

In der Darstellung werden die Unterschiede im Knochenfeinbau von *Cranium* und *Humerus* deutlich. Schädelknochen werden zu den platten Knochen gezählt. *Tibia*, *Humerus*, *Femur* hingegen zählen zu den langen Röhrenknochen. Im Aufbau unterscheiden sie sich vor allem in der Anzahl und Ausprägung kompakter Knochenschichten. Röhrenknochen bestehen aus einer ausgeprägten, mehrerer Millimeter dicken *Substantia compacta*, die besonders im Diaphysenbereich stark ausgebildet ist. Darunter befindet sich die Knochenbälkchenstruktur (*Substantia spongiosa*). Hingegen sind platte Knochen, wie die Schädelknochen, durch einen mehrschichtigen Aufbau charakterisiert. Die *Substantia spongiosa* wird durch zwei dünne *compacta*-Schichten umschlossen.

Zunächst wurden alle Quantifizierungsergebnisse genomischer- und mtDNA betrachtet. Die *Substantia compacta* ist speziell bei langen Röhrenknochen besonders gut ausgeprägt (Abbildung 4.4), so dass aufgrund eines ausgeprägten *compacta*-Anteils bei Fragmenten aus den Regionen: *Humerus*, *Femur* und *Tibia* die höchste DNA-Ausbeute vermutet wurde. Die Fragmente dieser Regionen wurden alle dem Diaphysenbereich entnommen. Hingegen wurde eine geringere DNA-Ausbeute der vier Schädeldachfragmente vermutet, was sich jedoch nur teilweise bestätigte. Zu untersuchende Schädeldachfragmente wurden vorwiegend dem Scheitelbein der vier Schädel entnommen. An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der Funde 1 und 2 näher analysiert- und vorgestellt werden (Tabelle 4.1). Die höchste extrahierbare gesamt DNA bei Fund 1 fand sich am überzähligen *Humerus*-Knochen mit $0,089 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Die niedrigsten Ausbeuten von $0,01 \text{ ng}/\mu\text{l}$ und $0,017 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ließen sich bei diesem Fund aus dem DNA-Isolat des Schädeldaches und einem weiteren *Humerus*-Fragment quantifizieren. Bei Fund 2 ließ sich die höchste Ausbeute aus dem DNA-Isolat eines überzähligen *Tibiaschaftes* quantifizieren ($0,04 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Aus dem Schädeldachfragment dieses Fundes konnte keine gDNA isoliert werden. Die Angaben quantifizierter DNA sind in Relation zum gesamten aufgearbeiteten Knochenmehl zu betrachten (1 - 3 g). Für eine Beurteilung der *compacta*-Stärken wurden die Entnahmestellen und die einzelnen Knochenfragmente maßstabsgerecht fotografiert und beurteilt. Die Stärken der *compacta*-Anteile waren in einem Intervall von zwei bis acht mm einzuordnen.

Fund	Region	quantifizierte gDNA [$\text{ng}/\mu\text{l}$]	quantifizierte mtDNA [mtGE]	Stärke der <i>Substantia compacta</i> [$\text{mm } \emptyset$]
Fund 1				
	<i>Calvarium</i>	0,017	3332	ca. 2
	<i>Humerus</i> re.	0,01	58494	6
	<i>Humerus</i> re., zus.	0,089	2722	7
	<i>Femur</i> re.	0,039	6971	7
	<i>Femur</i> li.	0,022	27531	7
	<i>Femur</i> li., zus.	0,023	17319	8
	<i>Tibia</i> re.	0,035	41476	5
Fund 2	<i>Calvarium</i>	0	75635	2 x 2
	<i>Humerus</i> re.	0,003	9877	5
	<i>Femur</i> re.	0,013	26512	7
	<i>Tibia</i> li.	0,008	392240	6
	<i>Tibiaschaft</i> li., zus.	0,04	45789	5
	<i>Tibia</i> re.	0,017	23128	6

Tabelle 4.1: **Gegenüberstellung der Quantifizierungsergebnisse (gDNA) und der Ausprägung der *Substantia compacta* von Fund 1 und Fund 2.**

Die Ergebnisse der gDNA-Quantifizierung weisen im Vergleich der beiden Funde darauf hin, dass die Knochen des Fundes 1 besser erhalten sind. Dieser Unterschied lässt sich durch die mtDNA- Quantifizierungsergebnisse nicht feststellen.

4.5 Etablierung der mtSNP-Analyse in der molekulargenetischen Forensik

Der Hauptziel der vorgestellten Forschungsarbeit bestand in einer Analyse von mtSNPs aus der kodierenden und nichtkodierenden Region der mtDNA aus lang gelagertem Knochen- und Zahnmateriale. Dabei stand das methodische Vorgehen für die mtSNP-Systeme sowie eine kritische Diskussion der Ergebnisse im Vordergrund. Weiterhin sollten vorgestellte mtSNPs in robusten Multiplexansätzen etabliert werden. In den folgenden Abschnitten werden die erforderlichen Maßnahmen und die zugehörigen Ergebnisse der Etablierung vorgestellt.

4.5.1 Vorversuche und Optimierung

4.5.1.1 Einstellung der Oligonukleotidkonzentrationen

Die Primerkonzentrationen für die Multiplex-PCR und der anschließenden SNaPshot-PCR der drei Multiplexansätze wurden in umfangreichen Vorversuchen getestet und optimiert. Die Einstellung der Konzentrationen erfolgte in den drei vorgestellten 8-plex-Systemen: System 1 [VJP04], System 2 [BPP03], System 3 [BPP03] (Tabelle 4.2). Eine Testung der Konzentrationen wurde zunächst an Speichelproben durchgeführt. Die ausgewählten mitochondrialen Marker wurden infolge der Einzelbasenverlängerung mittels des SNaPshot-Kits analysiert und über die Kapillarelektrophorese detektiert.

Die Amplifikationsbedingungen für die Multiplex-PCR und die Einzelbasenverlängerung wurden kaum variiert. So wurden die angegebenen Annealingtemperaturen für die Primer beibehalten. Ebenso wurde die Zyklenzahl für die Amplifikationen nicht verändert. Unter einer Annealingtemperatur von 64 °C konnten die 24 mitochondrialen Marker amplifiziert werden. Die Primer für eine Multiplex-PCR wurden jeweils 1:10 verdünnt. Dieser Verdünnungsfaktor wurde beibehalten und erwies sich als geeignet. Die Konzentrationen der SNaPshot-PCR-Primer musste in aufwendigen Einzeltestungen jedoch separat eingestellt und aufeinander abgestimmt werden. In mehreren, aufeinanderfolgenden Etappen wurden hierfür verschiedene Konzentrationen getestet. Ausgehend von den jeweiligen Signalstärken, welche aus den Elektropherogrammen abzulesen waren, wurden diese optimiert. Es wurde darauf geachtet, dass Primerkonzentrationen so gewählt werden, dass ausgewogene Allelfluoreszenzsignalintensitäten erzeugt werden. Um einen Eindruck über den Zusammenhang zwischen gesamt DNA-Konzentration in der Probe und der einzusetzenden Konzentrationen der Analyse-Primer zu erhalten, wurden in ersten Versuchen alle drei 8-plex-Systeme von Proben mit bekannter gesamt DNA-Konzentration analysiert. Eingesetzte Probenkonzentrationen lagen in den meisten Fällen um 1 ng/μl genomischer DNA. Hinzuzufügen ist, dass an dieser Stelle noch keine Informationen über die tatsächliche Kopienzahl vorhandener mtDNA-Moleküle in der Probe vorlag. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Sensitivität zwischen den ent-

sprechenden Primern der drei Multiplexsysteme, was sich in der relativ breiten Spanne resultierender Konzentrationen bemerkbar macht (Tabelle 4.2).

System	SNaPshot-Primer	c [μM]
System 1	4793-R	0,04
	10211-R	0,1
	5004-F	0,13
	7202-F	0,13
	16519-R	0,03
	12858-F	0,04
	4580-R	0,04
	477-F	0,05
System 2	11251G-F	0,009 - 0,007
	14798-F	0,009 - 0,007
	1719-F	0,007 - 0,005
	15904-R	0,01 - 0,005
	709-R	0,025 - 0,018
	12372-F	0,0125 - 0,005
	3010-R	0,014 - 0,009
	7028-F	0,03 - 0,017
System 3	13708-F	0,004 - 0,0028
	14766-F	0,01 - 0,005
	9055-F	0,01 - 0,007
	6365-F	0,018
	1811-F	0,014 - 0,009
	8251-R	0,02
	6776-R	0,02 - 0,017
	8697-R	0,013 - 0,008

Tabelle 4.2: **Eingesetzte SNaPshot-Primer Konzentrationen.**

Aufgeführt sind eingesetzte Konzentrationen der Primer in der SNaPshot-Amplifikation für jedes der drei 8-plex-Systeme. Aufgrund der Tatsache, dass die Primerkonzentrationen der Systeme 2 und 3 für jedes Isolat separat optimiert werden musste, wird hier nur eine empfohlene Konzentrationsspanne angegeben. Ausgehend von einer Ausgangskonzentration von 50 μM jeder Primerlösung und dem Einsatz von jeweils 0,4 μl je SNaPshot-Primer in einem Reaktionsansatz von 10 μl , wurde jeder Primer mit einer Ausgangskonzentration von 2 μM , ohne Verdünnung, eingesetzt. Die in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungen aus der Ausgangskonzentration errechnet.

Um genauere Aussagen über den Einfluss an mtDNA-Templatemolekülen auf gewählte Analyse-Primerkonzentrationen in der SNaPshot-PCR treffen zu können, wurden die Ergebnisse aus der simultanen Quantifizierung von mtDNA und gDNA für die Optimierung verwendet. Die Etablierung des qrt-PCR Assays erwies sich an dieser Stelle als hilfreich. Neben enthaltener gDNA in den Isolaten, konnten nun auch Aussagen über den Einfluss der mtDNA-Moleküle auf die Profilverläufe der drei Systeme getroffen werden. Unter dem Einsatz einer gleichbleibenden Anzahl an mtGE, sollten standardisierte Primerkonzentrationen für die SNaPshot-PCR aller drei Systeme ermittelt werden. Das einzusetzende Volumen an mtDNA-Template in der Multiplex-PCR, war abhängig von der Anzahl an quantifizierten mtDNA-Molekülen im DNA-Isolat. Für die Festlegung eines Standardwertes an einzusetzender mtDNA-Menge wurden zunächst alle quantifizierten mtGE-Ergebnisse gemittelt. Über die Größe eines vollständigen mtDNA-Genoms wurde die Menge an vorliegender mtDNA in den Isolaten, bestimmt. Dieser Wert diente als Standardwert, nach dem die anderen Proben ausgerichtet wurden. Das einzusetzende Volumen an Isolat wurde abschließend durch den Quotienten aus einer standardisierten mtDNA-Menge von $0,4679 \text{ fg}/\mu\text{l}$ mtDNA-Template (oder 27531 mtGE) und ermittelten mtDNA-Konzentrationen jeder der Probe errechnet:

$$V_{\text{Isolat}} = \frac{mtDNA_{\text{Standard}}(0,4679 \text{ fg})}{c(mtDNA_{\text{Probe}})}, \text{ wobei}$$

$$c = \frac{mtGE \times (1,699586 \times 10^{-14} \text{ fg})}{3 \mu\text{l}}$$

Die Ausgangskonzentrationen der DNA-Isolate errechneten sich aus dem in der Multiplex-PCR max. einzusetzendem Volumen an DNA-Template ($3 \mu\text{l}$) und den ermittelten mtDNA-Mengen jeder Probe. Im Ergebnis dieser oben beschriebenen Absicht einer Standardisierung durch den Einsatz einer gleichbleibenden Anzahl an mtDNA-Molekülen, zeigten sich nur geringfügig Erfolge. Einige Knochenprofile zeigten einen balancierten Verlauf in allen drei 8-plex-Systemen. Bei anderen Proben wiederum, traten immer noch viel zu hohe Signalstärken auf (Abbildung 4.5), sodass an dieser Stelle geschlussfolgert werden konnte, dass wohl weniger die Anzahl an mtDNA-Molekülen, sondern mehr das Wissen über die Qualität der mtDNA aus langgelagertem Untersuchungsmaterial eine Rolle bei der Optimierung der Elektropherogramme spielt.

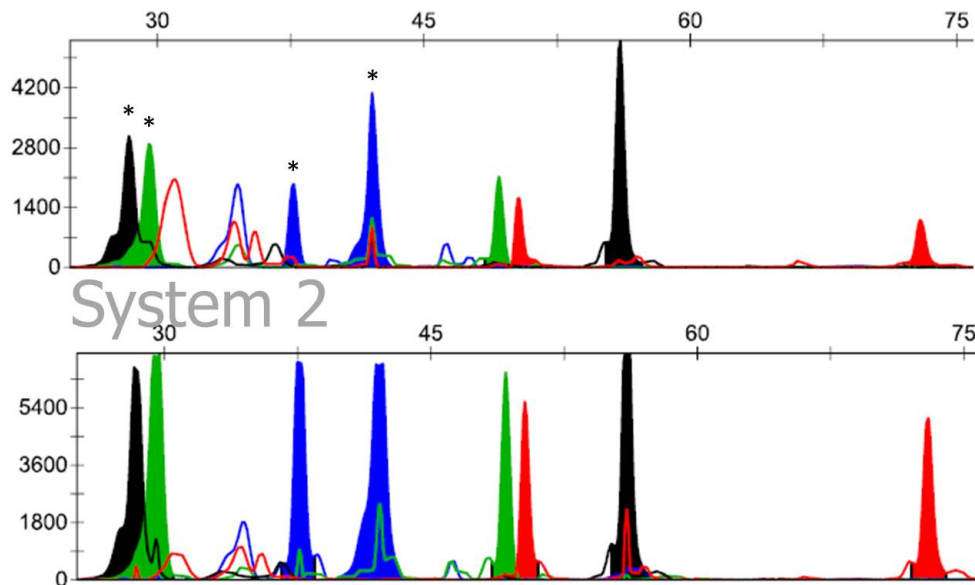


Abbildung 4.5: **Vergleich der Signalstärken aus der Multiplexanalyse (System 2) unter Einbeziehung der Ergebnisse aus dem qrt-PCR-mtDNA-Assay.**

Abgebildet sind die Elektropherogramme einer *Tibia* und eines *Femur*-Fragmentes von Fund 2. Die Profile zeigen eine Multiplexamplifikation der mtSNPs aus System 2. Diese zeigen den Einfluss an dem Einsatz gleichbleibender mtDNA-Molekülzahlen. Bei gleicher eingesetzter mtDNA-Menge in der Multiplex-PCR resultieren Profile mit stark unterschiedlichen Signalstärken für die Marker (*). Bei beiden Profilen wurden die gleichen Konzentrationen für die Analyse-Primer eingesetzt.

4.5.1.2 Testung der Analyse-Primer im Singleplex und Multiplexverfahren

Bevor die mtSNPs im Multiplexverfahren getestet und analysiert wurden, erfolgte eine Funktionsanalyse der Analyse-Primer im Singleplexverfahren. Das Ziel bestand dabei in der Überprüfung einer exakten Amplifikation und Detektion ausgewählter mtSNPs. Für dieses Vorhaben wurden zunächst entsprechende mitochondriale Regionen in einer Multiplex-PCR koamplifiziert, wobei die Amplifikation in den drei 8-plex-Systemen erfolgte. Anschließend wurden die dem mtSNP entsprechend synthetisierten Analyse-Primer in Einzelansätzen geprüft. Die Detektion spezifischer Peaks erfolgte kapillarelektrophoretisch. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte nach den folgenden Gesichtspunkten: Signalspezifität, Bewertung unspezifischer Signale bzw. Artefakte und mögliche Allelausfälle.

Die Amplifikation und Detektion der mitochondrialen Marker aus System 1 verlief problemlos. Mit einer Ausnahme konnten alle Signale eindeutig dem entsprechenden mtSNP zugeordnet werden. Lediglich der ursprünglich aufgezeichnete Polymorphismus T14470A des Systems 1 [VJP04] konnte in mehreren Ansätzen nicht detektiert werden. Dieser Polymorphismus wurde aus diesem System 1 nachfolgend ausgeschlossen. Weiterhin konnten bei Einzeltestungen aller Analyse-Primer des Systems keine

unspezifischen Signale festgestellt werden, die eine Signalzuordnung negativ beeinflussten. Der Abstand von drei nts bis acht nts zwischen den Analyse-Primern erwies sich als günstig, sodass keine Überlagerungen der Peaks festgestellt werden konnten. Mögliche Verunreinigen eingesetzter Oligonukleotide konnten durch mitgeführte Leerkontrollen ausgeschlossen werden. Die Einzeltestung der SNaPshot-Primer des Systems 2 und die Zuordnung allelspezifischer Signale erfolgte nicht ohne Hindernisse. Bedingt durch einen Abstand von lediglich 2 nts zwischen den Analyse-Primern der Marker A11251G und T14798C kam es zu einer Verschiebung allelspezifischer Peaks. Es war zu beobachten, dass das Signal für A11251 bei einer Detektion eines Cytosins an Position 14798 im Profil als zweites Signal detektiert wurde (Abbildung 4.6). Dieses wäre jedoch laut Länge des Analyse-Primers an erster Stelle im Profil zu erwarten gewesen. In der Ausprägung T14798C und 11251G konnten beide Signale eindeutig auseinander gehalten werden. Eine weitere Verschiebung allelspezifischer Signale wurde bei den Markern G12372A und G709A deutlich. Dabei wurde das Signal für die Position 12372 bei allen getesteten Proben vor der Position 709 detektiert, unabhängig vom jeweiligen Polymorphismus.

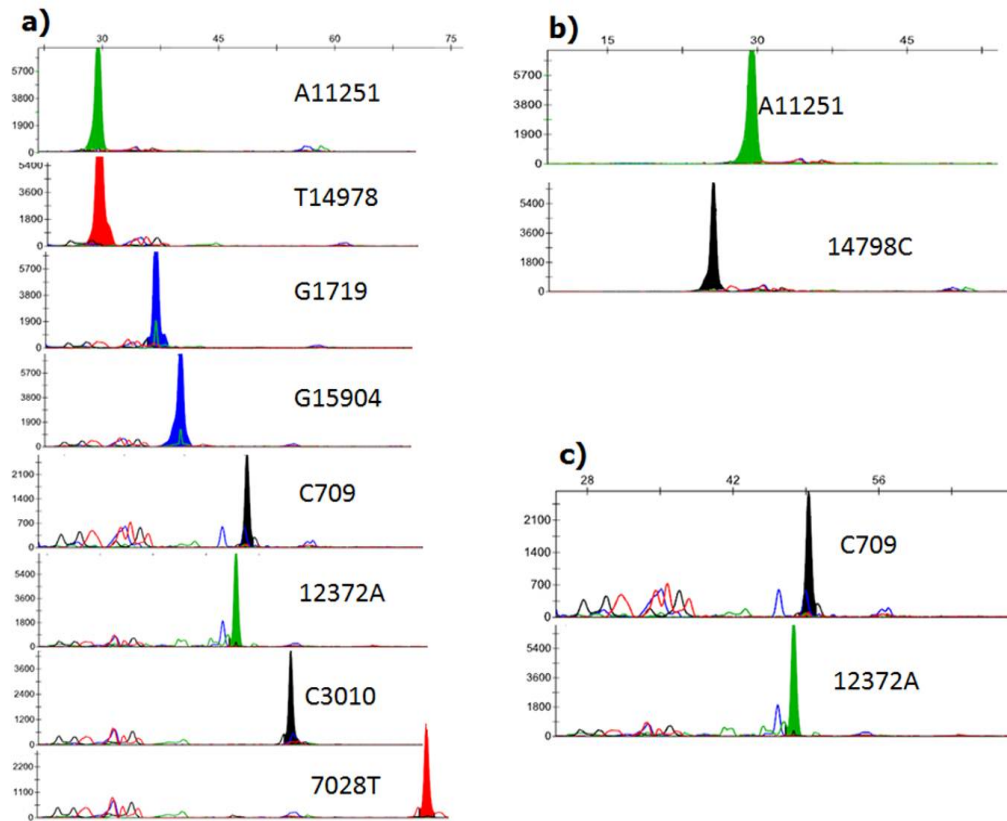


Abbildung 4.6: **Singleplexanalyse System 2.**

Zu erkennen sind die Ergebnisse aus den Einzeltestungen spezifischer Analyse-Primer des Systems 2. **a)** zeigt die Ergebnisse aus der Einzeltestung der Analyse-Primer für entsprechende mitochondriale Marker aus einer kapillarelektrophoretischen Detektion. Alle Analyse-Primer waren intakt und lieferten die erwünschten Ergebnisse. Als Testprobe diente ebenfalls aufbereitetes Knochenmaterial, welches jedoch nicht zum Untersuchungsumfang gehörte. In **b)** wird die Verschiebung der Signale für A11251 und 14798C, deutlich. Eine weitere Verschiebung wurde für die Allele C709 und 12372A bemerkt. Entgegen der Annahme, dass aufgrund der Länge des Analyseprimers für die Position 709, dass entsprechende Signal zuerst im Elektropherogramm auftaucht, wird dieses im Regelfall hinter dem für die Position 12372 detektiert. Im Bereich zwischen 30 nts und 36 nts sind beschriebene, unspezifische Signale zu erkennen. Die Signalgebung deutet nicht auf zusätzliche spezifische Signale hin. Da diese aufeinanderfolgenden Ausschläge bei jeder Einzeltestung der Primer auftauchten, sind diese eher Messschwankungen oder der Qualität der Primer zuzuordnen.

Auch hier unterscheiden sich die Fragmentlängen beider Analyse-Primer nur um 2 nts. Alle weiteren allelspezifischen Signale konnten den restlichen vier Markern zugeteilt werden (G1719A, C15904T, G3010A, C7028T). Außer den beschriebenen biallelischen Zuständen wurden keine zusätzlichen Allelzustände der untersuchten mtSNPs gefunden. Im Bereich zwischen 30 nts und 36 nts fiel eine unruhige baseline mit mehreren, aufeinanderfolgenden, unspezifischen Signalen (400 - 900 RFU) auf. Dieses Phänomen war in jeder der Einzeltestungen sichtbar. Die Verlaufsscharakteristik wies auf unspezifische Signale hin, evtl. hervorgerufen durch Schwankungen bei der Messung oder durch die Qualität der Template-mtDNA. Ähnlich wie beim System 2 wurden bei System 3 im Rahmen von Einzeltestungen, im Bereich von 30 nts bis 40 nts (600 RFU - ca. 4000 RFU) aufeinanderfolgende Farbausschläge detektiert. Die Zuordnung positionsspezifischer Signale beeinflusste dieser Sachverhalt jedoch nicht. Eine Abhängigkeit zwischen allelspezifischen und unspezifischen Signalen wurde nicht festgestellt. Eine Einzeltestung des Analyse-Primers für den Polymorphismus G9055A ließ mehrere, unspezifische Signale erkennen. Zudem war das allelspezifische Signale für G9055 durch seine Gestalt nur schwer zu zuordnen (Abbildung 4.7).

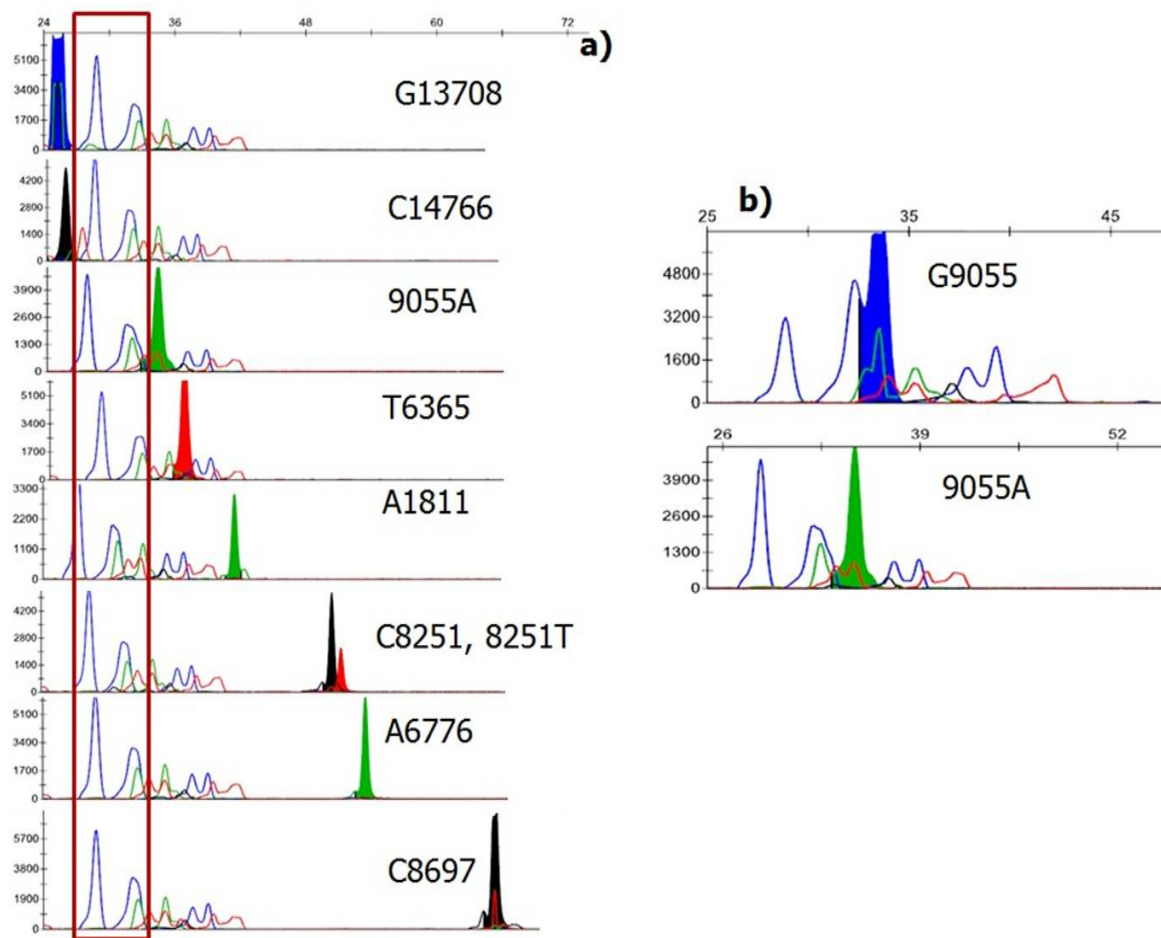


Abbildung 4.7: **Singleplexanalyse System 3.**

Zu erkennen sind die Ergebnisse aus den Einzeltestungen spezifischer Analyseprimer des Systems 3. **a)** zeigt die Ergebnisse aus der Einzeltestung der Analyse-Primer für entsprechende mitochondrialen Marker aus einer kapillarelektrophoretischen Detektion. Die Einzeltestungen weisen alle unspezifische und relativ hohe Signale im Bereich von 30 nt bis 40 nt (600 RFU - ca. 4000 RFU) auf. In einer nachfolgenden Amplifikation der Marker im Multiplexverfahren wurden diese zum Teil sichtbar (roter Rahmen). Diese konnten nach der Zurordnung der Signale durch die Einzeltestungen aus den Probenprofilen jedoch ausgeschlossen werden. In **b)** ist der Polymorphismus an Position 9055 zweier Knochenproben, dargestellt. Das obere Elektropherogramm zeigt die Ausprägung im Wildtyp (G9055). Im unteren Elektropherogramm ist das Signal für die Mutation in Form eines detektierten Adenins zu erkennen. Während das Signal für 9055 deutlich und von umliegenden unspezifischen Peaks abzugrenzen ist, kann das für G9055 nur schwer von möglichen Artefakten oder unspezifischen Signalen abgegrenzt werden.

Im Anschluss an die Einzeltestungen der Analyse-Primer folgte die Analyse ausgewählter mtSNPs im Multiplexverfahren. Dabei sollten die entsprechenden Analyse-Primer auf Eignung für eine Amplifikation entsprechender Marker in den vorgegebenen drei 8-plex-Systeme geprüft werden. Die Ergebnisse aus dieser Analyse wurden auf mögliche Kreuzreaktionen zwischen den Primern, Überlagerungen allelspezifischer Peaks, ausgewogene Allelfluoreszenzintensitäten und ausreichend hohe Signalstärken für die 24 Marker hinterfragt. Grundlage für die Auswertung der drei 8-plex-Systeme der Knochen- und Zahnprofile bildeten die Ergebnisse aus den Singleplexversuchen. Für die Unterscheidung allelspezifischer Signale, wurden die Analyseprimer SNaPshot-PCR um einen sequenzunspezifischen Überhang am 5'-Ende verlängert. Dies bewirkt eine Analyse der mtSNPs im Multiplexverfahren, basierend auf den unterschiedlichen Fragmentlängen. Mit diesem Hintergrund, wurden die mtSNP-Profile auf Signalüberlagerungen hin geprüft. Zusammengefasst ließen sich hierbei für alle drei Systeme keine Überlagerungen feststellen. Die beabsichtigten Längenunterschiede der Analyseprimer war somit ausreichend. Lediglich die oben beschriebenen Signalverschiebungen in System 2 und 3 wirkten sich auf die Interpretation der Ergebnisse aus. Dazu konnten zwischen den Profilverläufen aus den entsprechenden Publikationen [VJP04, BPP03] und denen der Forschungsarbeit keine groben Abweichungen erkannt werden. Der Ausschluss der Marker G3010A und C7028T aus dem ursprünglichen Panel von Vallone et al. [VJP04], wirkte sich nicht auf den Profilverlauf aus. Des Weiteren verlief die Multiplexamplifikation mitochondrialer Marker des Systems 1 unproblematisch. Es wurden jeweils ausreichend hohe Signalstärken erreicht. Das System erwies sich als äußerst robust gegenüber mtDNA-Konzentrationsschwankungen der untersuchten Knochen- und Zahnisolate. Weiterhin konnten keine Kreuzreaktionen zwischen den Analyseprimern identifiziert werden. Die mitochondrialen Marker aus System 2 und 3 konnten ebenfalls im Multiplexverfahren amplifiziert werden. Nachdem die Zuordnung indifferenter Peaks der Positionen 11251, 14798, 12372, 709 aus System 2 und 3 durch die Einzeltestungen geklärt wurden, war es möglich, auch bei diesen beiden Systemen eine exakte Analyse der Profilverläufe vorzunehmen. In der Koamplifikation der mtSNPs des Systems 3 wurde eine weitere Signalverschiebung an den Positionen 8251 und 6776 identifiziert. Bei der Kombination der Allele A6776 und 8251T wurde das allelspezifische Signal für A6776 vor 8251T detektiert. Dieses Phänomen wurde nicht in den Einzeltestungen deutlich. Unspezifische Signale wurden vorwiegend durch den Analyseprimer für G9055A im dritten System im Bereich von 29 nts bis 42 nts hervorgerufen. Im Fall von System 2 und 3 konnte zudem eine gegenseitige Beeinflussung der Signalstärken durch Variation der Konzentrationen der jeweiligen Analyse-Primer erkannt werden. Mitgeführte Leerkontrollen bei den Multiplexamplifikationen zeigten keine ausreichend hohen Signale, welche die Interpretation der Profile negativ beeinflusst hätten.

4.5.1.3 Fragmentlängenanalyse

Für die Analyse mehrerer mtSNPs in einem Ansatz wurden die Oligonukleotide so gestaltet, dass sich an dem sequenzspezifischen Teil ein 5'-Überhang befindet, um eine Überlagerung von verschiedenen Markerpeaks im Elektropherogramm zu verhindern. Der sequenzunspezifische Anteil wurde aus den Publikationen von Vallone et al. und Brandstätter et al. [VJP04, BPP03] für die drei 8-plex-Systeme unverändert übernommen. Die Analyse-Primer für das System 1 [VJP04] wurden in einem Abstand von drei bis acht Nukleotiden erstellt. Für die Analyse-Primer des Systems 2 und 3 wurden Abstände von zwei bis 16 Nukleotide ausgenutzt. Nach der kapillarelektrophoretischen Auftrennung sollten die detektierten Nukleotidabstände der Markerpeaks theoretisch etwa in diesen Abstandsintervallen liegen. Die vorgenommene Fragmentlängenanalyse beabsichtigte die Betrachtung von theoretischen Fragmentlängen der Analyseprimer aus den Publikationen: Vallone et al. und Brandstätter et al. [VJP04, BPP03], zu tatsächlichen Allelpeaks der Marker. Aufbauend darauf wurden die Abstände zwischen den Allelpeaks der 24 Marker bewertet und auftretende Abweichungen notiert (Tabelle 4.3).

Die vorgenommene Betrachtung diente im Anschluss der Erstellung von auf die mtSNPs zugeschnittenen Panels für die drei 8-plex-Systeme. Diese unterstützen eine automatisierte und exakte Zuordnung allelspezifischer Peaks mit der GeneMapper ID Analysesoftware 2.0 und ermöglichen eine erleichterte Auswertung der Elektropherogramme.

Die Fragmentlängenanalyse eingesetzter Analyseprimer und die Bewertung tatsächlicher mtSNP-Markerpeaks erfolgte unter der Einbeziehung der erforderlichen Daten aus den Elektropherogrammen von 23 Knochenfragmenten und 19 Zähnen. Zu bemerken ist, dass allelspezifische Signale unter Einbeziehung der Verlängerung um ein Nukleotid, komplementär zum nachzuweisenden mtSNP, bewertet wurden. Mit Hilfe der GeneMapper ID Analysesoftware 2.0, wurden die Markerpeaks analysiert und entsprechende Längenangaben übernommen. Für die Erstellung spezifischer Panels für die Zuordnung der Markerpeaks der drei 8-plex-Systeme war darauf zu achten, dass die Angaben so genau wie möglich getroffen werden, um eine falschpositive Zuordnung unspezifischer Peaks zu verhindern. Bei System 1 war ein Längenunterschied von zwei bis fünf Nukleotiden zwischen theoretischer Primerlänge und detektiertem Markerpeak zu beobachten. Die größte Abweichung trat an Position 4798 auf. Der Abstand zwischen den Markerpeaks des Systems wich lediglich um ein bis zwei Nukleotidpositionen von den Angaben aus der Publikation ab. Somit waren die Markerpeaks eindeutig zuzuordnen. In der Theorie werden meist Längenabweichungen von max. fünf Nukleotiden ohne weiteres toleriert (Tabelle 4.3). Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, dass sich die Profile im System 1 einander sehr glichen, sodass für die meisten Positionen nur eine Allelausprägung der mtSNPs aufgeführt wurde. Beim Vergleich zwischen erwarteter und tatsächlicher Position der Markerpeaks ergaben sich für die acht Analyse-Primer des zweiten Systems Längenunterschiede in einem Intervall von zwei bis fünf Nukleo-

tidpositionen. Ebenfalls in einem tolerierbaren Bereich. In Folge dieser Analyse wurden die in den Singleplexversuchen eruierten Ergebnisse für die Positionen A11251G und T14798C bestätigt. Anhand der Markerpeakpositionen für die biallelischen Ausprägungen beider mtSNPs wird eine Verschiebung des allelspezifischen Signals für 14798C an die erste Position deutlich. Ähnliches gilt für die Marker G709A und G12372A, hier eine grundsätzliche Verschiebung der Signale zu verzeichnen war. Zum Teil wurden für dieses System größere Abstände zwischen den Markerpeaks, als theoretisch erwartet, detektiert. So lagen die Markerpeaks der mtSNPs G1719A und G15904A um 3 Nukleotidpositionen weiter auseinander. Beim System 3 betrug die Differenz zwischen theoretischer Analyseprimer-Länge und detektiertem Markerpeak zwei bis fünf Positionen. Ebenfalls akzeptabel. Die Abstände zwischen den Markerpeaks des Systems stimmten mit den theoretischen überein (Tabelle 4.3)

mtSNP	theoretische Länge Analyseprimer [nts]	Markerpeak (tatsächlich) [nts]	Allelfragmentlängen (min.-max.) [nts]			
System 1			G	A	C	T
(A4793G)*	22	28, 15				29,79 - 30,71
(C10211T)*	30	34,19	33,93 - 34,64			
T5004C	34	37,87				37,65 - 38,14
A7202G	42	45,89		45,65 - 46,35		
(T16519C)*	46	51,04	50,70 - 51,44			
C12858T	50	52,85			51,67 - 53,24	
(G4580A)*	54	57,23			56,97 - 58,23	
T477C	58	60,63				60,45 - 60,91
System 2						
A11251G	24	29,09	27,18 - 30,5	29,52 - 30,04		
T14798C	27	29,88			27,48 - 28,66	30,54 - 31,31
G1719A	35	37,11	34,40 - 37,93			
(C15904T)*	37	42,27	42,06 - 42,47	42,81 ± 0		
(G709A)*	44	49,69			47,56 - 49,41	50,28 - 50,56
(G12372A)	46	48,18	47,52 - 47,96	49,13 - 49,42		
(G3010A)*	53	56,16			56,02 - 56,21	56,16 - 56,88
C7028T	69	72,7			71,88 - 72,00	56,98 - 73,13
System 3						
G13708A	20	25,86	24,73 - 25,66	27,85 - 27,96		
C14766T	22	27,36			26,09 - 26,2	27,4 - 27,4
G9055A	29	33,75	32,47 - 33,65	34,76 - 34,88		
T6365C	32	36,54				36,3 - 36,99
A1811G	40	43,83	43,46 - 43,71	43,97 - 44,27		
(G8251A)*	47	52,69			53,07 - 53,56	54,32 ± 0
(T6776C)*	49	53,64		53,46 - 53,8		
(G8697A)*	61	65,7			65,30 - 66,41	66,16 - 66,43

Tabelle 4.3: **Fragmentlängenanalyse.**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse aus einer Fragmentlängenanalyse der Analyse-Primer. Dabei wurden theoretische Längenangaben mit tatsächlich detektierten Markerpeaks verglichen und bewertet. * = Analyse-Primer wurden in reverse Richtung zum Matrizenstrang synthetisiert, um Überschneidungen relevanter mitochondrialer Markerregionen in der Multiplexamplifikation zu vermeiden. In der Auswertung der Elektropherogramme müssen dadurch komplementäre Nukleotide betrachtet werden. Grau markiert wurden Positionen, bei denen eine Signalverschiebung auftrat. Die theoretischen Längen der Analyse-Primer wurden aus den Publikationen [VJP04, BPP03] übernommen. Analyisierte Markerpeaks werden hier über das arithmetische Mittel ausgedrückt.

4.5.2 Etablierung der mtSNP-Analyse aus lang gelagertem Knochenmaterial

Der Schwerpunkt der Arbeit verfolgte das Ziel 24 mtSNPs sowohl aus der kodierenden als auch aus der nichtkodierenden Region der mtDNA über die Minisequenzierung nachzuweisen und nachfolgend kapillarelektrophoretisch zu detektieren. Die Analyse fand an schwer zu typisierendem Untersuchungsmaterial in Form von ca. 60 Jahre bodengelagertem Skelettmaterial statt. Das Ziel der Arbeit war dabei weniger eine umfangreiche Typisierung des Untersuchungsmaterials, wie es z.B. mit STRs möglich ist, vielmehr sollte das methodische Potential der mtDNA überprüft und für eine mtSNP-Analyse ausgenutzt werden. Eine beabsichtigte Methodenetablierung des Vorgehens richtete sich nach der Handhabbarkeit des methodischen Vorgehens und der Übertragung von Reaktionsbedingungen auf alle drei Multiplexsysteme. Für forensische Analysen sind der Nachweis von mtSNPs dann bedeutsam, wenn die Typisierung von humanbiologischen Spurenmaterial mit herkömmlichen STR-Kits nicht mehr möglich ist.

Die Analyse der vorgestellten 24 mtSNPs wurde an allen aufgearbeiteten 22 Knochenfragmenten und 19 Zähnen aus Ober- und Unterkiefer durchgeführt. Dabei konnten jeweils acht der 24 mitochondrialen Marker in drei Multiplexsystemen amplifiziert werden [VJP04, BPP03] (Abbildung 4.8). Mit Hilfe der Einzelbasenverlängerung (Minisequenzierung) konnten alle mtSNPs analysiert und nachfolgend über das Prinzip der Kapillarelektrophorese detektiert werden. Die Auswertung der mtSNP-Elektropherogramme erfolgte durch Hinzunahme der GeneMapper ID Software 2.0. Durch eine Erstellung systemspezifischer Panels konnte eine automatisierte Auswertung der allelspezifischen Peaks erreicht werden. Alle drei 8-plex-Systeme wurden für die Analyse unter den angegebenen Amplifikationsprotokoll analysiert. Während für das System 1 die aufgeführten Standardkonzentrationen (siehe Tabelle 4.2) der Analyse-Primer für die mtSNP-Analyse auf alle Proben übertragen wurden, mussten hingegen die Konzentrationen der Analyse-Primer aus System 2 und 3 für jede Knochenprobe separat optimiert werden. Für die Optimierung der Knochenprofile wurden weiterhin die Ergebnisse aus der mtDNA-Quantifizierung einbezogen. Unter dem Einsatz einer gleichbleibenden mtDNA-Menge für jede Probe in der Multiplexamplifikation und einheitlichen Konzentrationen für jeden Analyse-Primer sollten für die SNaPshot-PCR annähernd gleiche Amplifikationsergebnisse erzielt werden.

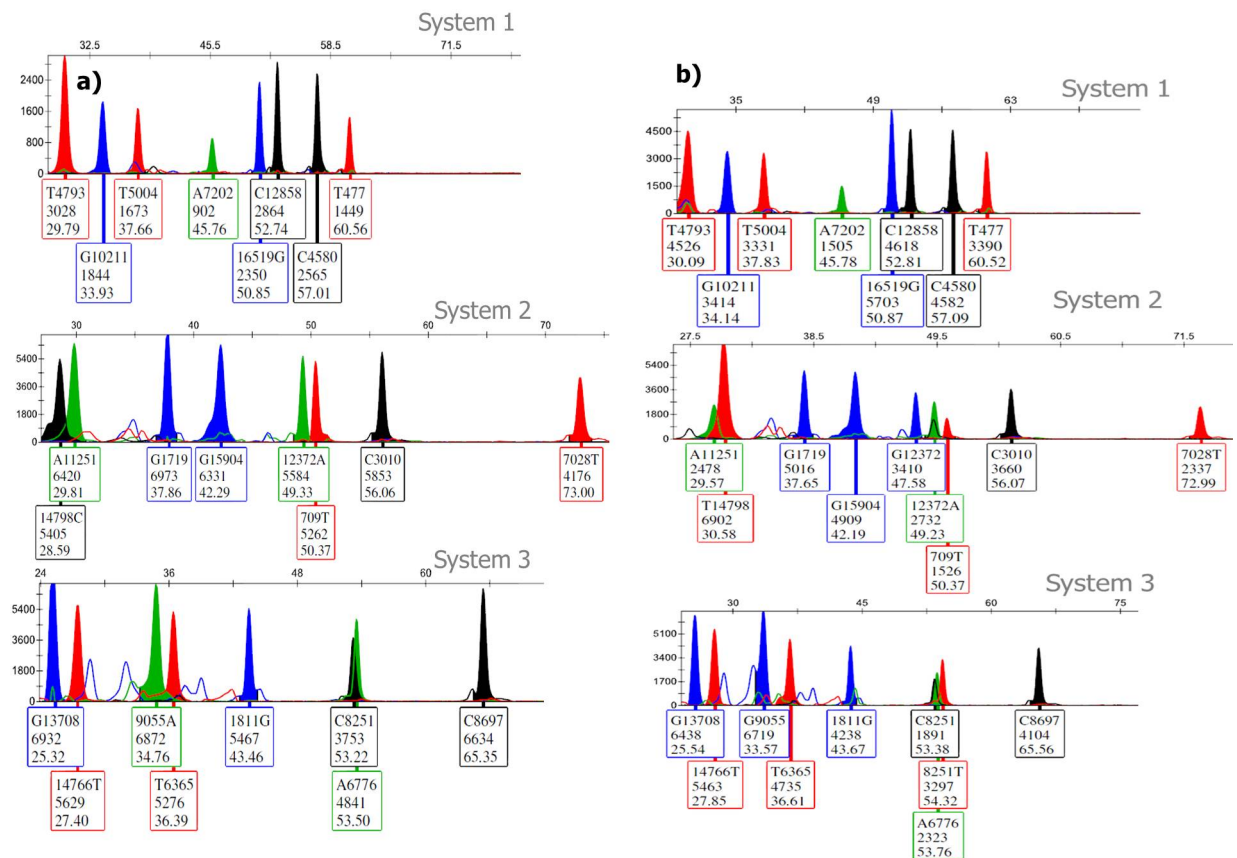


Abbildung 4.8: **Multiplexamplifikation System 1 bis System 3.**

Die Abbildung zeigt vollständige Profilverläufe für die Knochen Femur (Fund 1) (a) und Tibia (Fund 2) (b). Die 24 mitochondrialen Marker wurden erfolgreich in den beschriebenen drei 8-plex-Systemen amplifiziert. Mit Hilfe von systemspezifischen Panels konnten die Positionen im Elektropherogramm mit zugehöriger RFU und detektierter Fragmentlänge beschrieben werden.

Weiterhin ist hervorzuheben, dass bei Knochenproben, die kein Quantifizierungsergebnis genomischer DNA lieferten, gut auswertbare mtSNP-Profile der drei 8-plex-Systeme analysiert werden konnten (Abbildung 4.9).

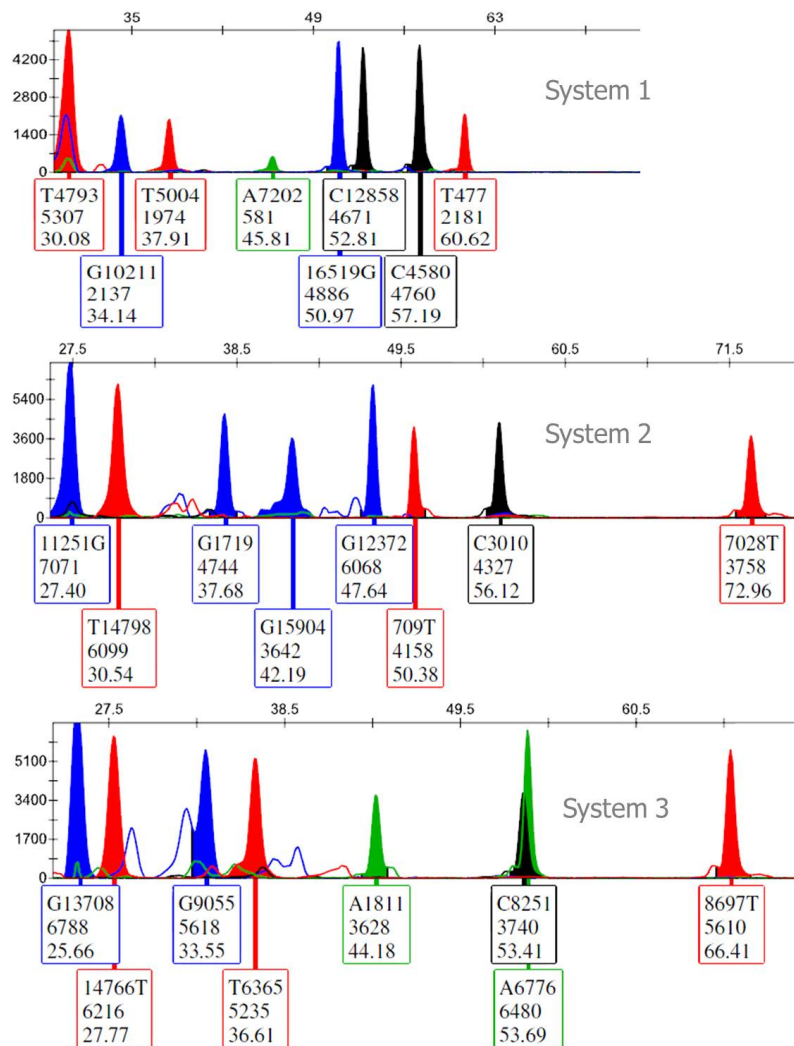


Abbildung 4.9: **Multiplexamplifikation System 1 bis System 3 am Beispiel einer Knochenprobe ohne Quantifizierungsergebnis gDNA.**

Obwohl für das Schädeldachfragment keine DNA quantifiziert wurde, konnten problemlos für alle drei mtSNP-Systeme, Profilverläufe ausgewertet werden.

Die mit dem System 1 erzielten Analyseergebnisse verdeutlichten, dass dieses ein sehr robustes Multiplex-System ist. Nach wenigen Vorversuchen konnten die ermittelten Analyse-Primerkonzentrationen für die SNaPshot-PCR auf alle Knochenproben übertragen werden. Es traten keine Artefakte oder zusätzliche unspezifische Peaks im Profilverlauf auf. Dies erleichterte die Auswertung erheblich. Schwankungen der mtDNA-Konzentrationen scheinen die Sensitivität des Systems kaum zu beeinflussen. Auffällig war, dass untersuchte Knochenproben ähnliche und wenig polymorphe Profilverläufe für das System 1 zeigten. So war die Profilcharakteristik: T4793, G10211, T5004, A7202, 16519G, C12858, C4580 und T477 bei fast allen Knochen- und Zahnproben festzustellen, mit Ausnahme zusätzlicher allelspezifischer Signale an einzelnen Positionen.

Es wurde versucht, ausgeglichene Allelfluoreszenzintensitäten zu erreichen. Überwiegend ausgeglichene Signalstärken wurden für die Marker T4793, G10211, T5004 und 16519G, C12858, C4580 erzielt. Das niedrigste Signal aus dem System lieferte der Marker A7202. Mit einer eingesetzten Konzentration von $0,04 \mu\text{mol}$ konnten in den überwiegenden Fällen kaum Fluoreszenzintensitäten über 1700 RFU erreicht werden. Im Vergleich mit den anderen Fluoreszenzintensitäten, die zum Teil über 5000 RFU lagen, ist dieser nur ungefähr 1/3 so stark. Die Position 16519 mutierte am häufigsten. Bei fast allen Knochenproben lies sich an dieser Position ein Guanin detektieren. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, die durch annotierte Austauschwahrscheinlichkeiten aus der Literatur untermauert werden [BLN⁺05]. Unspezifische Signale konnten bei diesem System lediglich vor der Position 4793 detektiert werden, welche jedoch auf Messschwankungen bei der kapillarelektrophoretischen Detektion zurückzuführen sind.

Für eine exakte Bewertung der Elektropherogramme, welche aus der Multiplexamplifikation der acht mitochondrialen Marker des Systems 2 resultierten, mussten die Profile für jede Probe einzeln optimiert werden. Die Optimierung verlief hauptsächlich über die Einstellung der Konzentration für die Analyse-Primer, da unter dem Einfluss konstanter mtDNA-Kopienzahlen der Knochenproben, nur wenig Verbesserungen der Profilverläufe erreicht wurden. Eingesetzte Primerkonzentrationen für die SNaPshot-PCR lagen in einem Intervall von $0,005 \mu\text{M}$ bis $0,03 \mu\text{M}$. Beschriebene Artefakte bzw. unspezifische Signale im Bereich von 30 nts bis 36 nts beeinflussten die Zuordnung allelspezifischer Signale nicht (Abbildung 4.10). Nachdem auftretende Signalverschiebungen für die Marker A11251G, T14798C, (G709A)* und G12372A in Einzeltestungen deutlich wurden, konnten die Knochenprofile für dieses System bewertet werden. Im Gegensatz zum System 1, wurde hier kein homologer Profilverlauf beim Vergleich der Elektropherogramme untereinander deutlich. Die Elektropherogramme zeigten deutlich individuellere Profilverläufe. Die Positionen: 11251, 14798, 709, 7028 zeichneten sich durch eine besonders hohe Mannigfaltigkeit aus. Entsprechend hohe Austauschwahrscheinlichkeiten für genannte Positionen wurden ebenfalls in der Arbeit von Coble et al. verzeichnet [CJO⁺04]. Wie für System 1, wurde versucht ausgeglichene Fluoreszenzintensitäten für die Marker zu erreichen. Das Signal für den Polymorphismus an Position 14798 war sowohl im Wildtyp (T14798) als auch in der Mutation (14798C) sehr dominant. Für die Marker G1719A, (C15904T)* und G12372A, konnten im Vergleich besonders ausgeglichene Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden (Abbildung 4.10). Die Stärke der Signale für die Marker (G3010A)* und C7028T wurde stark durch die Qualität der mtDNA beeinflusst.

Auch für System 3 konnten die acht mitochondrialen Marker im Multiplexverfahren für jede Knochenprobe koamplifiziert werden. Wie bei System 2 mussten die Analyse-Primerkonzentrationen für jede zu untersuchende Knochenprobe separat eingestellt werden. Artefakte in den Elektropherogrammen und unspezifische Signale wurden durch die Einzeltestungen der Analyse-Primer aus den Elektropherogrammen der Multiplex-

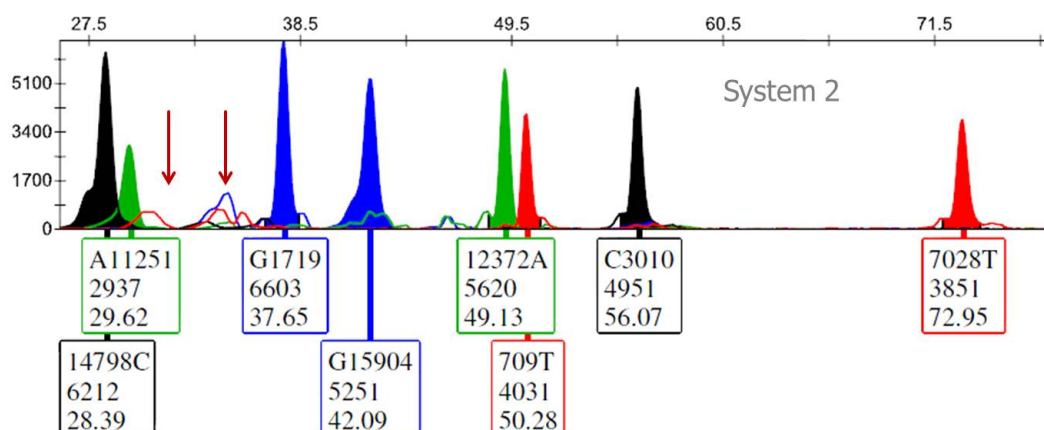


Abbildung 4.10: **Multiplexamplifikation System 2.**

Profilverlauf für das Multiplexsystem 2. Im Bereich von 30 nt bis 36 nt, sind unspezifische Ausschläge der baseline zu erkennen (max. 1700 RFU) (rote Pfeile), welche jedoch die Zuordnung allelspezifischer Signale nicht beeinflusste. Dieser charakteristische Profilverlauf für eine *Tibia* von Fund 1 zeigt des Weiteren ein dominantes Signal für den mtSNP 14798C. Für die Marker G1719A, (C15904T)* und G12372A, sind relativ ausgeglichene Fluoreszenzintensitäten zu beobachten.

systeme ausgeschlossen (Abbildung 4.11). Die Konzentrationen für entsprechende Oligonukleotide wurden in einem Intervall von $0,02 \mu\text{M}$ bis $0,0028 \mu\text{M}$ getestet. Bei Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten für die Marker des Systems 3 war auffällig, dass insbesondere die Signalstärken für die Marker G13708A und C14766T sehr dominant waren ($> 5000 \text{ RFU}$). Das gesamte System zeigte bei der Mehrzahl der Knochenproben ausgeglichene Allelfluoreszenzintensitäten. Eine Individualität der Profile für System 3 wurde durch die besonders polymorphen Positionen: G9055, 1811 und 8697 erreicht.

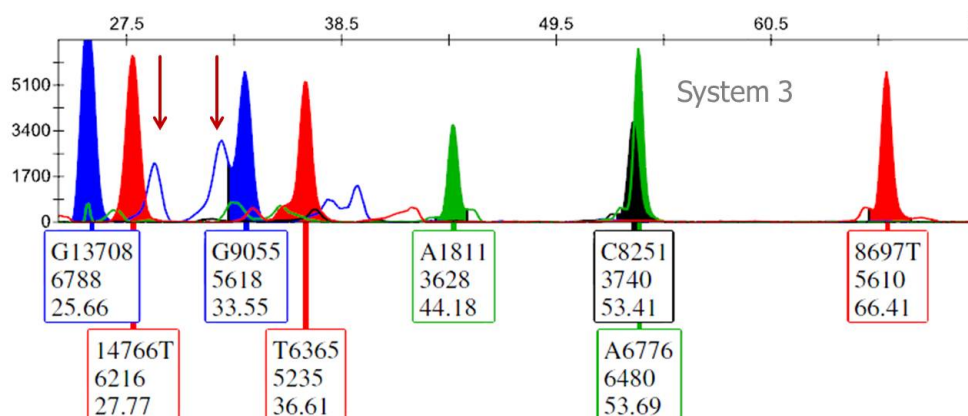


Abbildung 4.11: **Multiplexamplifikation System 3.**

Profilverlauf für das Multiplexsystem 3. Beschriebene, unspezifische Signale befinden sich vor allem im Bereich von 28 nts bis 35 nts (rote Pfeile). Besonders fällt die unspezifische Gestalt des Peaks an Position 9005 ins Auge.

Bei molekulargenetischen Analysen von autolytischem oder fäulnisverändertem biologischen Material muss immer mit einer möglichen Degradation der gDNA und mtDNA gerechnet werden. Dies gilt insbesondere bei lang gelagertem oder historischem Skelettmaterial. Eine Herausforderung für die Etablierung von mtSNP-Systemen in der forensischen Molekulargenetik besteht mitunter in der Wahl von mtSNPs, welche auch bei degradierter mtDNA analysiert werden können. Es wurde schnell deutlich, dass die Qualität der mtDNA für die Analyse von mtSNPs aus sehr altem Untersuchungsmaterial ausschlaggebend ist. Bei der Auswertung der Profile fielen sehr niedrige Elektropherogramme auf, die zum Teil auch durch Allel drop-outs mehrerer Positionen gekennzeichnet waren. Dies zeigte sich bei den entsprechenden Knochenproben in allen drei 8-plex-Systemen. Sehr niedrige Profilverläufe erschwerten oftmals die Zuordnung allelspezifischer Signale zu den Markern. Relativ hohe Signalstärken unspezifischer Signale, die für das System 2 und 3 beschrieben wurden, konnten teilweise nur schwer von spezifischen Markerpeaks getrennt werden. Auf eine mögliche Degradierung der mtDNA wurde beim System 1 durch extrem niedrige Signalstärken für die Marker A7202G, (C10211T)*, T5004C und T477C hingewiesen. Ein kompletter Ausfall der Signale war überwiegend für die Marker A7202G und T477C zu vermerken. Hingegen lieferten die Marker C12858T und (G4580A)* noch relativ hohe Signalstärken. Der wiederholte Wegfall allelspezifischer Signale für die Marker C7028T und (G709A)* bei System 2 ließ ebenfalls Rückschlüsse auf eine Degradierung der mtDNA bei mehreren Proben zu. Jedoch konnten auch bei diesem System noch regelmäßig hohe Signalstärken für die Positionen 14798 und 3010 detektiert werden. Für das System 3 wurden relative Fluoreszenzintensitäten von maximal 2000 RFU detektiert. Hierbei konnten für die Marker A1811G, (G8251A)*, (T6776C)* und (G8697A)* lediglich Signalstärken bis maximal 600 RFU erreicht werden, was eine klare Trennung von spezifischem- und unspezifischem Markerpeak erschwerte. In diesem Zusammenhang kam es oft zu Fehlinterpretationen einiger Signale durch eine automatisierte Auswertung. Die Marker G13708A und C14766T lieferten noch relativ eindeutige Signalintensitäten (Abbildung 4.12).

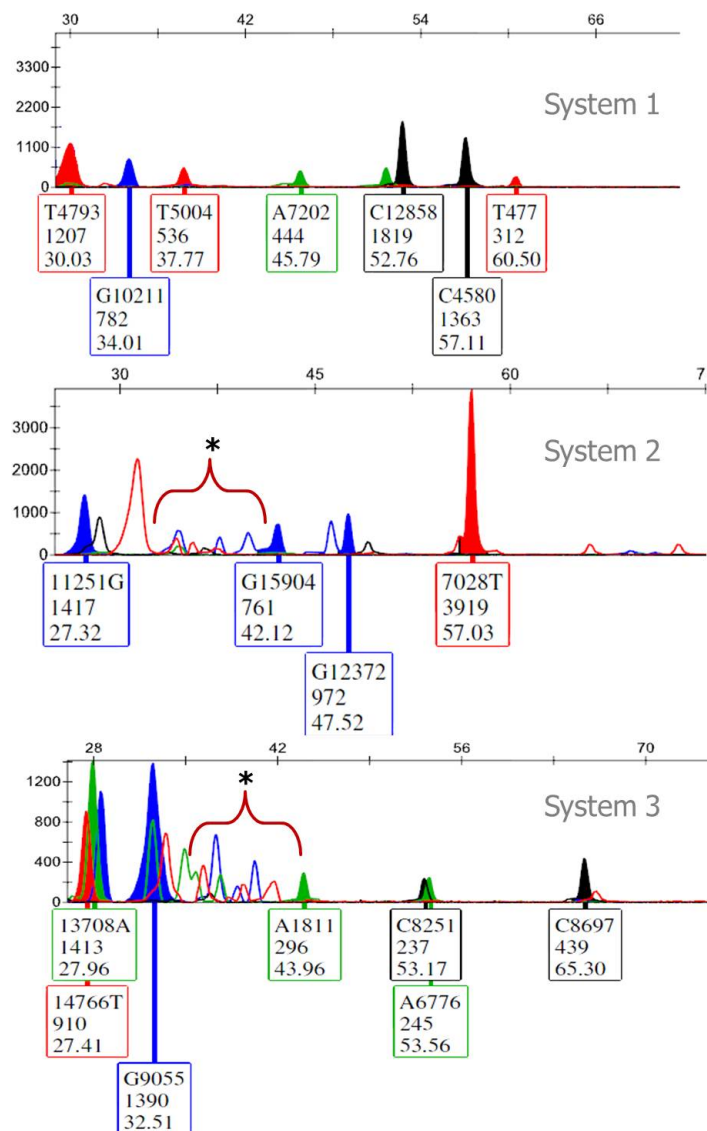


Abbildung 4.12: **Ergebnis einer Multiplexamplifikation der drei Systeme unter der Annahme einer Degradation der mtDNA.**

Die Abbildung zeigt einen Profilverlauf eines *Femur*-Knochens, bei dem eine Degradierung der mtDNA vermutet wird. Die Vermutung wird durch dargestellte Profilverläufe der drei 8-plex-Systeme untermauert. Eine mögliche Degradierung der mtDNA wird bei System 1 durch vordergründig niedrige Signalstärken an den Positionen 7202, 10211, 5004 und 477 belegt. Bei System 2 und 3 wird deutlich, dass im Fall besonders niedriger RFU eine Zuordnung allelspezifischer Signale durch eine automatisierte Auswertung, meist nicht gelingt. Dabei können unspezifische Signale nur schwer von spezifischen getrennt werden. Dieser Sachverhalt wird durch die Klammer (*) in der Abbildung angezeigt.

4.5.2.1 Analyse von Mischprofilen und Heteroplasmie

Für eine Überprüfung der Sensitivität der Systeme gegenüber Mischprofilen und Heteroplasmievarianten, wurden zu Testzwecken zwei Knochenproben von Fund 2 eingesetzt. Für die Multiplexamplifikation wurde versucht, annähernd gleiche mtDNA-Mengen einzusetzen. In der anschließenden SNaPshot-PCR wurden gleiche Volumenanteile der entsprechenden Multiplex-PCR-Produkte verwendet. Beide Profile unterschieden sich an Positionen: 11251, 12372 (System 2) und 1811, 8251, 8697 (System 3). Bei System 1 gab es keine Unterschiede. Im Ergebnis konnten nicht alle unterschiedlichen Allele detektiert werden. System 3 hat die Unterschiede, unter den hier verwendeten Analyse-Primerkonzentrationen und dem Einsatz angegebener mtDNA-Mengen, am genauesten angezeigt. Dabei wurden verschiedene Allelzustände an den Positionen 1811, 8251 und 8697 detektiert. Hingegen zeigte der Profilverlauf für das System 2 keine unterscheidbaren Signale für die jeweiligen Positionen an (Abbildung 4.13).

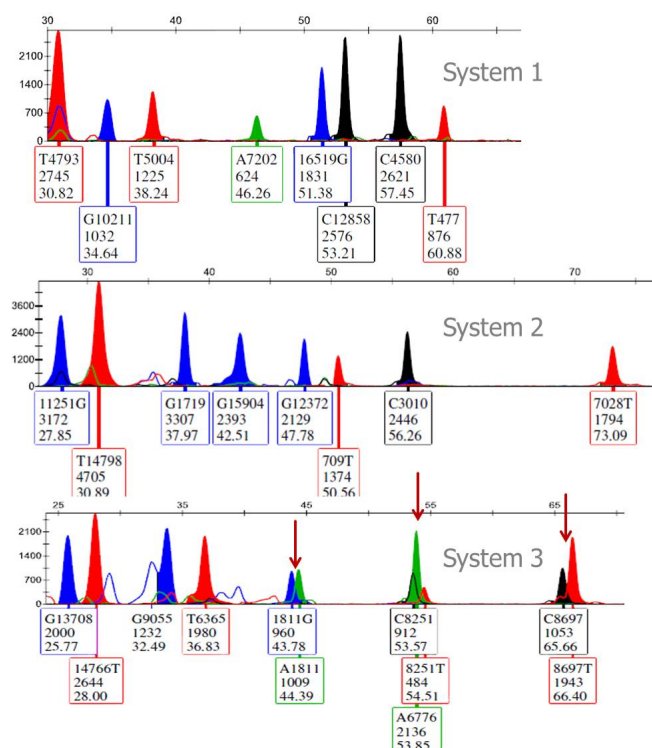


Abbildung 4.13: **Analyse von Mischprofilen mit Hilfe der 8-plex-Systeme.**

Die Abbildung zeigt die Überprüfung der drei 8-plex-Systeme auf Sensitivität für die Erkennung von Mischprofilen oder Heteroplasmie. Im Ergebnis konnten nicht alle unterschiedlichen Allele detektiert werden. System 3 hat die Unterschiede, unter den hier verwendeten Analyse-Primerkonzentrationen und dem Einsatz angegebener mtDNA-Mengen, am genauesten angezeigt. Dabei wurden verschiedene Allelzustände an den Positionen 1811, 8251 und 8697 detektiert (rote Pfeile). Hingegen zeigte der Profilverlauf für das System 2 und 1 keine unterscheidbaren Signale für die jeweiligen Positionen an.

4.5.3 Etablierung der mtSNP-Analyse aus lang gelagertem Zahnmaterial

Die drei 8-plex-Systeme wurden mit gleichem Erfolg an dem aufgearbeiteten Zahnmaterial getestet werden. Es gelang alle mitochondrialen Marker im Multiplexverfahren zu detektieren und anschließend zu analysieren. Genauso wie bei dem Knochenmaterial zeigten sich die beschriebenen unspezifischen Signale und ebenso Signalverschiebungen an einzelnen Positionen der Systeme. Jedoch zeigten die Elektropherogramme von Oberkiefer- und Unterkieferzähnen der Skelette, im Vergleich zu den Profilen der Knochenproben, Unterschiede im Bereich der Fluoreszenzintensitäten vereinzelter Marker (Abbildung 4.14).

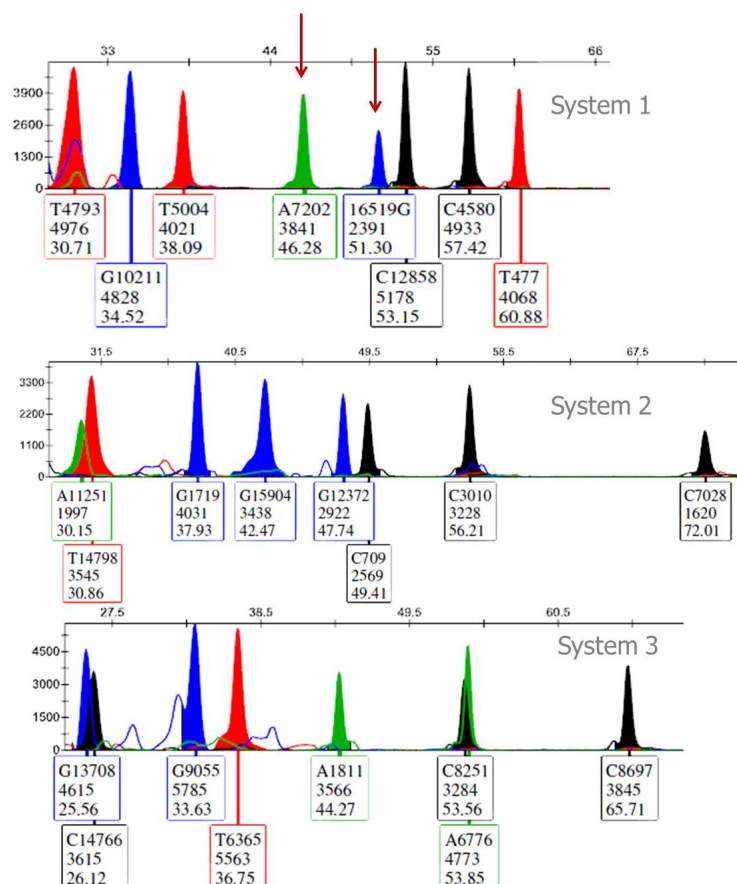


Abbildung 4.14: **Testung der drei Systeme am Zahnmaterial.**

Die Abbildung zeigt die Multiplexamplifikation der drei 8-plex-Systeme am Beispiel des Zahnmaterials aus dem Unterkiefer von Fund 4. Zu erkennen ist eine gesteigerte Fluoreszenzintensität für die Marker A7202G und T477C des Systems 1 im Vergleich zu den Knochenproben. Jedoch wurden häufig geringere Fluoreszenzintensitäten für die Position 16519 ersichtlich (rote Pfeile).

Unter der Voraussetzung des konstanten Einsatzes gleicher mtDNA-Mengen in der Multiplex-PCR und der Übernahme der oben aufgeführten Analyse- Primerkonzentrationen wurden die vom Zahnmaterial erhaltenen Profile mit denen der Knochen verglichen.

Interessant war, dass vorwiegend stärkere Fluoreszenzintensitäten für die Marker A7202G und T477C des Systems 1 im Vergleich zu den Knochenproben erreicht wurden. Ein ähnlicher Sachverhalt war auch für die anderen beiden 8-plex-Systeme festzustellen. Allerdings konnten für diese Systeme keine regelmäßigen Steigerungen spezifischer Fluoreszenzintensitäten der Marker vermerkt werden (Abbildung 4.14).

5 Diskussion

5.1 Phenol-Chloroformextraktion der DNA

Zur Überprüfung der Effizienz des angewandten Isolationsprotokolls wurden die erzielten Quantifizierungsergebnisse mit ebensolchen aus dem Jahr 2011 verglichen. Im vergangenen Jahr wurden bereits lange Röhrenknochen sowie Zahnmaterial desgleichen Skelettfundes aufgearbeitet und gesamt-DNA isoliert. Die aufgearbeiteten Mengen an Knochenmehl lagen hier zwischen 2,35 g und 6,84 g. Die Mengen an Zahnmehl umfassten 1,6 g bis 2,41 g. Infolge der Isolation mit Hilfe des GEN-IAL Kits und der anschließenden Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform, ergaben sich gesamt-DNA-Ausbeuten für das Knochenmaterial im Bereich von $0,002 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bis $0,18 \text{ ng}/\mu\text{l}$ und für das Zahnmaterial $0,066 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bis $0,629 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Verglichen mit den Quantifizierungsergebnissen der gegenwärtigen Phenol-Chloroform Isolation lassen sich nur geringfügige Unterschiede erkennen. Die DNA-Ausbeuten der Knochen stimmen in beiden Fällen so gut wie überein. Untersuchungsmaterial, welches gegenwärtig keine Quantifizierungsergebnisse lieferte, sollte nochmals aufgearbeitet werden, wobei im Anschluss größere Mengen im Bereich von 3 g bis 5 g an Knochenmehl für die Isolation eingesetzt werden sollten.

Im Allgemeinen ist das vorgestellte Protokoll, mit der Kombination aus der DNA Isolation mit dem GENIAL-Kit und einer anschließenden Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform aus lang gelagertem und historischem Knochenmaterial gut geeignet. Durch mehrmaliges Hinzugeben der organischen Lösungen Phenol und Chloroform wird DNA in reinster Form erhalten. Für nachfolgende Amplifikationsversuche bildet das Vorhandensein von ausreichend Template-DNA (mtDNA und gDNA) aus lang gelagertem Knochen- und Zahnmaterial eine gute Basis für erfolgreiche Typisierungsversuche. Die dreitägige EDTA-Behandlung des mechanisch aufgearbeiteten Knochen- und Zahnmaterials ermöglicht eine gründliche Freisetzung eingeschlossener Zellen, welche aufgrund ihrer Lage im Hydroxylapatitapparat gegen eine Degradation geschützt sind. Derartig geschützte Zellen können durch den alleinigen Verdau mit Proteinase K nicht aus dem komplexen Hydroxylapatitapparat der Knochenmatrix herausgelöst werden. Dies kann zu einer zeitlichen Verlängerung des Zeitraumes, in dem noch DNA aus dem Knochen- oder Zahnmaterial gewonnen werden kann, führen. Die Effizienz des Protokolls könnte durch Verlängerung der Fällungszeit der DNA über Nacht noch gesteigert werden.

5.2 Etablierung des mtDNA-qrt-PCR-Assays

Um genaue Aussage über die Kopienzahl vorhandener mtDNA-Moleküle in den untersuchten Proben zu erlangen, wurde ein qrt-PCR-Assay für die simultane Quantifizierung von genomischer und mitochondrialer DNA verwendet. Das Assay eignet sich insbesondere für Proben, bei denen eine Degradierung der mtDNA durch ungünstige Lagerungsbedingungen, vermutet wird. Ist es nicht möglich eine Quantifizierung auf dem üblichen Weg vorzunehmen, so stellt die hier angewandte statistische Analyse für die Ermittlung vorhandener mtDNA-Molekülzahlen eine simple Alternative dar. Der Zusammenhang zwischen der abhängigen Variable „Ct-Wert“ und der unabhängigen Variable „mtGE“ wird durch die ermittelte Regressionsfunktion hinreichend gut approximiert. Die ermittelten Molekülzahlen sind plausibel. In Anbetracht dessen, dass jede Zelle, abhängig von der Gewebeart, mehrere 1000 Mitochondrien besitzt und jede dieser ca. fünf bis zehn mtDNA-Kopien beinhalten, sind resultierend mehrere tausend bis zehntausend mtDNA-Kopien möglich. Je nach Zellart kann das Verhältnis zwischen Kern- und mtDNA 1:1000 oder höher betragen. Die hohe Kopienzahl an mtDNA-Molekülen ermöglicht eine effektive Analyse von mtDNA aus lang gelagerten Knochen und Zähnen und auch dann, wenn sie sich im Zustand der Degradierung befindet. Ähnliche Analysen zeigten, dass es möglich ist, mehrere tausend Jahre altes Gewebe, Hart- und mumifizierten Weichgewebe, auf mitochondrialer Ebene zu analysieren.

5.3 Kontaminationsgrad der DNA-Isolate

Die robuste Konzeption und die gezielte Ausrichtung des PowerPlex® S5-Kits der Firma Promega ermöglicht die Erstellung vollständiger STR-Profile, auch beim Einsatz von geringen DNA-Mengen. Somit ist dieses Kit für die Analyse von aDNA und Low-Level DNA geeignet. Resultierende Amplifikatlängen von maximal 260 bp bilden eine gute Voraussetzung für eine molekulargenetische Analyse degradiert DNA. Ein Nachteil des Systems ist die geringe Anzahl integrierter Systeme und einer damit reduzierten Wahrscheinlichkeit intakte DNA-Abschnitte in degradierten Proben zu amplifizieren. Dementsprechend wird die Effektivität des PowerPlex® S5-Systems im Hinblick auf umfangreiche Typisierungsvorhaben, vermindert. Für die beabsichtigte Reinheitsüberprüfung der DNA-Isolate aus dem Knochen- und Zahnmaterial erfüllte das Kit mit fünf Systemen seinen Zweck. Im Rahmen der vorgenommenen Reinheitsüberprüfung konnte keine Fremd-DNA amplifiziert werden. Amplifikationen von Template-DNA < 1 ng und > 1 ng führen häufig zum Auftreten von Stutterpeaks. Zum Teil werden diese durch die Analysesoftware automatisch erkannt und nicht bewertet. Imbalancen im Profilverlauf können durch stochastische Effekte hervortreten. Dies ist gerade dann der Fall, wenn eine schlechte Qualität der Template-DNA und gleichzeitig nur noch wenig Template-DNA vermutet wird. Infolge von möglichen Fäulnisprozessen des Untersuchungsmaterials und/oder einer Erdlagerung, kann eine Amplifikation der DNA durch das Vorliegen bestimmter Inhibitoren (Huminsäuren etc.) gestört werden [NG94]. Wei-

terhin können Inhibitoren (z.B. EDTA-Reste oder enzymatische Inhibitoren), welche im Verlauf der DNA-Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden konnten, eine Amplifikation negativ beeinflussen. Dies kann z.B. zum Auftreten von Locus oder Allel drop-outs führen [Pro].

5.4 Gegenüberstellung der gDNA- und mtDNA-Ausbeute aus dem Untersuchungsmaterial

In Relation von isolierbarer DNA-Menge je Milligramm eingesetztem Knochenmehl sollte in ausgewählten Fällen geprüft werden, ob der Feinbau untersuchter Knochenfragmente Einfluss auf die Ausbeute an der gDNA bzw. mtDNA haben kann. Hierfür wurden vorrangig quantifizierte gDNA- und mtDNA-Mengen der knöchernen Strukturen der Skelettfunde 1 und 2 gegenübergestellt. Die Kenntnis darüber kann bei ebensolchen Untersuchungen an lang gelagertem oder historischen Untersuchungsmaterial sowie in forensischen als auch anthropologischen Untersuchungen, hilfreich sein. In diesem Sinne können resultierende Ergebnisse und Hypothesen den Aufarbeitungs- und Analyseverlauf erleichtern. In Fällen von molekulargenetischen Untersuchungen an jahrhundertealtem, historischen Knochenmaterial ist die DNA-Isolation aus besonders gut geeigneten knöchernen Regionen von Interesse.

Die Aufarbeitung insbesondere des Knochenmaterials gestaltete sich schwierig. Bedingt durch den Zustand des Knochenmaterials (Fäulnis, Verschmutzung) waren intensive Reinigungsprozesse erforderlich. Dieser bedeutete ein gründliches Abschleifen und somit auch ein Abtragen eines Teils der *Substantia compacta*, weshalb davon auszugehen war, dass zum Teil 1/3 der kompakten, äußeren Schicht durch den Reinigungsprozess verloren ging. Die Ergebnisse der gDNA und mtDNA-Ausbeuten gleicher Regionen variierten zwischen allen vier Funden stark, was wahrscheinlich zu einem großen Teil durch den Einsatz von unterschiedlichen Mengen an Knochenmehl (1 g - 3 g) bedingt ist. Da nicht explizit darauf geachtet wurde, jeweils gleich viel Knochenmehl in der DNA-Isolation einzusetzen sollten in weiteren Untersuchungen dieser Aspekt genauer verifiziert werden. Im vorgestellten Beispiel war es möglich, Teilaussagen über den Einfluss des Feinbaues zu treffen. Bei der Gegenüberstellung der gDNA-Ausbeuten und *compacta*-Stärken bei Fund 1, kann ein Einfluss des *compacta*-Anteils auf die isolierbare DNA-Menge festgestellt werden. Quantifizierungswerte nehmen mit einem zunehmenden *compacta*-Anteil zu. Die gleiche Aussage trifft auf den Fund 2 nicht in allen Fällen zu. Werden die Ergebnisse als Querschnitt über alle Quantifizierungsergebnisse der Knochenproben in Relation zur eingesetzten Menge an aufgearbeiteten Knochenmaterial und der Stärke der *Substantia compacta* betrachtet, so können Tendenzen erkannt werden. Tendenzen im Hinblick auf den Einfluss einer zunehmenden Stärke der *Substantia compacta* beim Knochenmaterial und der resultierenden gesamt DNA-Konzentration. Die folgende Abbildung stellt die gegenseitige Einflussnahme der Parameter: eingesetztes Knochenmaterial in der DNA-Isolation, die Stärke der *Substantia*

compacta und ermittelte durchschnittliche gesamt DNA-Konzentrationen dar (Abbildung 5.1).

Aus dem Diagramm heraus lassen sich zusätzlich zur Hypothese von MacHugh [MEB⁺00], Rückschlüsse über den Einfluss der Stärke der *Substantia compacta* auf die gesamt DNA-Ausbeute ableiten. Zur Untermauerung dieser Schlussfolgerung könnte ein ausreichend großer Untersuchungsumfang *cranialer* und *postcranialer* Skelettabschnitte aufgearbeitet werden. Des Weiteren wäre hier auch ein Vergleich zwischen rezenten und prähistorischem Untersuchungsmaterial denkbar.

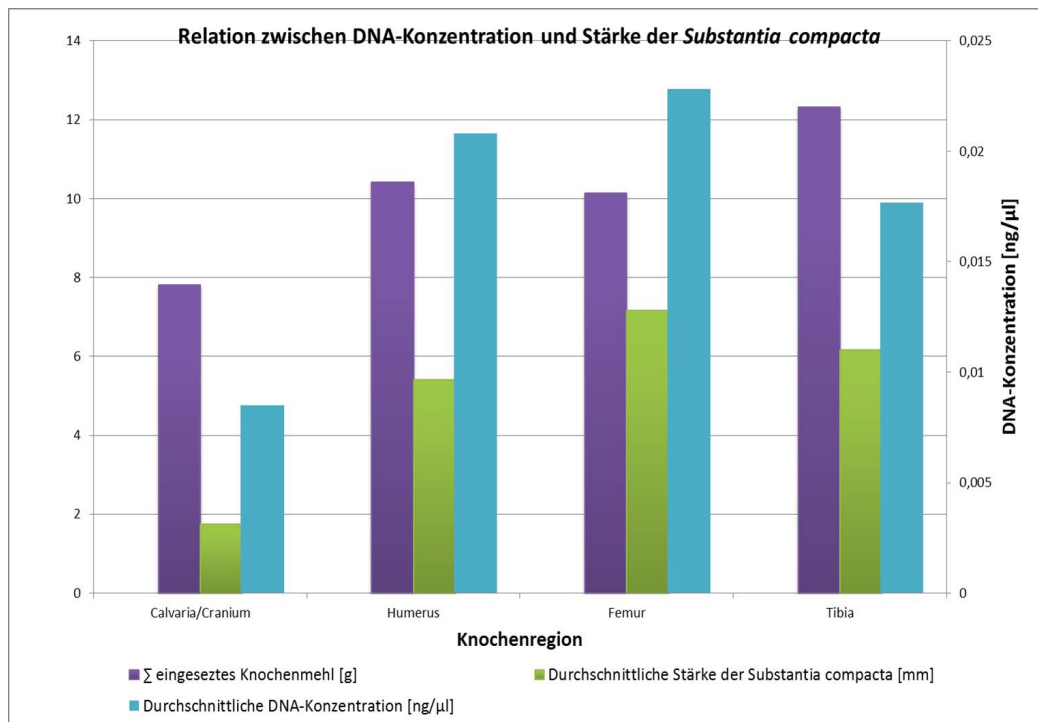


Abbildung 5.1: **Vergleich der Stärke der Substantia compacta der Knochenregionen.**

Die Charakteristik des Diagramms lässt Schlussfolgerungen bezüglich der Einflussnahme der Stärke der *Substantia compacta* auf die gesamt DNA-Ausbeute zu. Dargestellt sind untersuchte knöcherne Regionen in Relation zur Menge des Knochmaterials nach der mechanischen Aufarbeitung. Anhand der Höhe der Balken scheinen sich die Stärke der *Substantia compacta* und ermittelte DNA-Konzentrationen gegenseitig zu bedingen. So lässt sich deutlich erkennen, dass sich aus Röhrenknochen mit einer weitaus kompakteren *Substantia compacta* gegenüber den platten Knochen, auch höhere DNA-Ausbeuten erlangt werden und zudem die Zunahme der Stärke der *Substantia compacta* darauf Einfluss nimmt.

In Bezug auf die mtDNA-Kopienzahl lassen sich kaum Regularien ableiten. Für exaktere Analysen mit demselben Ziel sollten in jedem Fall genauere und mehr Informationen über das biologische Material einbezogen werden, wie z.B. eine exakte Beurteilung des Verottungs- und Mumifikationsprozess durch einen Experten.

5.5 Etablierung mitochondrialer SNPs in der molekulargenetischen Forensik

5.5.1 Vorversuche

Während umfangreicher Testläufe, die notwendig waren, um die Konzentrationen der eingesetzten Analyse-Primer einzustellen und aufeinander abzustimmen, wurden Unterschiede in der Sensitivität entsprechender Analyse-Primer festgestellt. Zunächst sollte der Zusammenhang von Probenkonzentration und eingesetzter Konzentration der Analyse-Primer geprüft werden. Ein genauer Zusammenhang konnte bei den DNA-Isolaten der Knochen- und Zahnproben nicht exakt festgestellt werden. Beim Vergleich der Systeme auf Robustheit gegenüber möglichen DNA-Konzentrationsschwankungen und der gleichzeitigen Übernahme gleichbleibender Analyse-Primerkonzentrationen, wurden Unterschiede deutlich. System 1 [VJP04] erwies sich als sehr robust gegenüber DNA-Konzentrationsschwankungen in den Proben. Anders als bei System 2 [BPP03] und System 3 [BPP03] beeinflussten sich Probenkonzentration und Primerkonzentration nicht signifikant. So konnten ausgeglichene Allelfluoreszenzsignalstärken bei allen Proben unter dem Einsatz der in Tabelle 4.2 angegebenen Analyse-Primerkonzentrationen, erzielt werden. Die Systeme 2 und 3 waren weitaus schwieriger und mit mehr Aufwand zu optimieren. Zum einen konnten, anders als bei System 1, keine Standardkonzentrationen für die Amplifikation entsprechender Marker festgelegt werden. Es war eine hohe Divergenz zwischen den Profilen zu erkennen. Für eine exakte Interpretation dieser Profile, mussten die Analyse-Primer der Multiplexsysteme 2 und 3 für jede Probe separat optimiert werden. Dies erforderte einen hohen Aufwand. Auf der Grundlage der Ergebnisse aus der mtDNA-Quantifizierung mittels qrt-PCR-Assay, sollte der genaue Einfluss von mtDNA-Template-Molekülen auf die Optimierung der Profile überprüft werden. Infolge dieser Analyse wurden gleichbleibende mtDNA-Mengen in der Multiplexamplifikation aller drei Systeme eingesetzt. Die Ergebnisse waren entgegen der Erwartungen sehr unterschiedlich. Zum Teil konnten Verbesserungen erreicht werden. Einige Markerpeaks waren jedoch immer noch sehr dominant, andere konnten dagegen aufgrund der Singalstärken nicht von unspezifischen Signalen bzw. Artefakten getrennt werden. Diese Beobachtungen waren vorallem bei System 2 und System 3 festzustellen. Das System 1 blieb nach den Erwartungen stabil. Die Profile lieferten ausgewogene und eindeutige Singnalstärken. Unter Integration dieser Ergebnisse aus der Einbeziehung der mtDNA-Quantifizierungsergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass gerade bei schwierig zu untersuchendem Material, wie langgelagertem Knochen oder auch Zahnmateriale, weniger die Kopienzahl, sondern mehr die Qualität der mtDNA eine Rolle bei der Optimierung solcher Profile spielt. System 1 wird weniger, als System 2 und System 3 von diesem Sachverhalt beeinflusst. Daher sollten unbedingt Vorbetrachtungen über den Degradierungsgrad der mtDNA unternommen werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass einige unspezifische Signale bei den Einzeltestungen der Primer zum Vorschein kamen. Hingegen waren die Leerkontrollen akzeptabel. Die vorgestellten Artefakte könnten zum einen auf das Alter der synthetisierten Analyse-Primer zurückzuführen sein. Die Primer für das System 2 und System 3 waren bereits im Jahr 2003 synthetisiert worden. Im Laufe der Jahre und durch den regen Gebrauch, könnten die Oligonukleotide beschädigt und die Spezifität vermindert worden sein. Weiterhin könnte die Template-mtDNA durch Folgen einer möglichen Degradierung Artefakte oder unspezifische Signale in der Marker-Umgebung nach sich gezogen haben. Die beschriebene Signalverschiebung der Marker: A11251G und T14798C sowie G12372A und (G709A)* des zweiten Systems wurde versucht durch den Vergleich der Molekulargewichte (Mg) und den G/C-Gehalt der Analyse-Primer zu erklären. Als 44 mer besitzt der Analyse-Primer 709-R ein Molekulargewicht von 13661 *g/mol* und einen G/C-Anteil von 52 %. Das synthetisierte Oligonukleotid für den Marker G12372A besitzt ein Molekulargewicht von 14649 *g/mol* und einen G/C-Anteil von 45 %. Es wird deutlich, dass die Verschiebung des Signals für den Marker (G709A)* hinter die Position 12372 nicht durch das Molekulargewicht begründet werden kann. Eine mögliche Ursache kann der erhöhte G/C-Gehalt von 52 % des Analyseprimers 709-R sein. Die Verschiebung des Signals für ein Cytosinpolymorphismus an Position 14798, vor A11251G, kann ebenfalls nicht allein durch ein höheres Molekulargewicht begründet werden. Mit einem G/C-Gehalt von 54 % besitzt der Analyse-Primer 11251-F eine erwartungsgemäß höhere Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber 14798-F mit einem G/C-Gehalt von 30 %. Jedoch sollte das Oligonukleotid 14798-F mit einem Molekulargewicht von 8556 *g/mol* nach 11251-F (Mg: 7528 *g/mol*) detektiert werden. Unter Einbeziehung der Tatsache, dass sich die Oligonukleotide jeweils um lediglich zwei nts in der Länge unterscheiden, ist es nicht unwahrscheinlich, dass durch mögliche Messschwankungen eine Verschiebung der Signale zustande kommt. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund für die erwähnten Signalverschiebungen an Position 8251 und 6776 aus System 3. Die entsprechenden allelspezifischen Signale konnten trotz dieser Tatsache gut zugeordnet werden. Weitaus kritischer waren die unspezifischen Signale um die Region des Markers G9055A zu beurteilen. Um diese Region ergaben sich unspezifische Signale im Bereich von ca. 600 RFU bis 4000 RFU. Womöglich sind diese auch durch das Alter des Analyse-Primers zu erklären. Eine weitere Ursache für diese hohen Signalintensitäten könnten jedoch auch umliegende, hochpolymorphe Positionen um G9055A sein. Ebendiese könnten durch den Analyse-Primer mit erfasst worden sein. Um entsprechende Hypothesen zu überprüfen sollte der Analyse-Primer für nachfolgende Tests über HPLC aufgereinigt werden. Des Weiteren kann auch eine Neusynthetisierung veranlasst werden. Die Analyse-Primer wurden zwar in Vorversuchen auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Selbsthybridisierung getestet, jedoch kann dies im Hinblick auf die Signalstärken um den Marker G9055A nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Nach einer korrekten Zuordnung der Signale für die 24 mtSNPs durch Einzeltestungen der Analyse-Primer, konnten diese auch in den drei 8-plex-System beurteilt wer-

den. Alle 24 Marker konnten in den drei beschriebenen Systemen koamplifiziert werden. Bei keinem der Systeme wurden Kreuzreaktionen zwischen den Oligonukleotiden oder auch Primerausfälle festgestellt. Der Ausschluss des Polymorphismus T14470A aus dem System von [VJP04] beeinflusste die Profilverläufe nicht. Als einziger Transversionspolymorphismus wurde dieser in der Arbeit von Vallone et al. [VJP04] schon als problematisch beschrieben. Hierbei wurde in mehreren Vorversuchen die Signalstärke des Markers T14470A optimiert. Dies gelang nur bedingt. Das Signal für den Marker T14470A war im Vergleich zu den anderen des Systems nur sehr niedrig. Aus diesem Grund wurde der Analyse-Primer folglich neusynthetisiert, um höhere Signalstärken zu erzielen. Jedoch konnte keine Steigerung erreicht werden. Äußerst zufriedenstellend waren die Profilverläufe des Systems 1. Unterschiedliche Primerkonzentrationen beeinflussten sich hier kaum. Anders bei System 2 und 3. Die durchgeführte Fragmentlängenanalyse der Analyseprimer verfolgte das Ziel einer Überprüfung zwischen theoretischer Primerlänge und tatsächlich detektierten allelspezifischen Signalen in den Elektrophogrammen. Des Weiteren erfolgte eine Überprüfung der Abstände zwischen den Markerpeaks. Vor diesem Hintergrund sollte weiterhin geprüft werden, ob allelspezifische Signale für die 24 mtSNPs korrekt zugeordnet werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sich die Signale für alle 24 Marker in den erwarteten Bereichen befanden. Längenunterschiede bis zu 5 Nukleotidpositionen wurden akzeptiert.

Die drei Systeme konnten für die mtSNP-Analyse aus dem Knochen- und Zahnmaterial verwendet werden. Im Allgemeinen lässt sich das gesamte Amplifikationsprotokoll auf die drei 8-plex-Systeme anwenden und erwies sich als günstig, auch für die Amplifikation degradierter Proben. Die Effizienz der Amplifikationsbedingungen wird zum einen durch unveränderte und übertragbare Amplifikationstemperaturen unterstrichen. Des Weiteren mussten DNA-Polymerasekonzentrationen nicht neu getestet oder eingestellt werden.

5.5.2 Etablierung der mtSNP-Analyse aus lang gelagertem Knochen- und Zahnmateri

Es gelang eine erfolgreiche Analyse beschriebener mtSNPs aus der kodierenden und nichtkodierenden Region der mtDNA an ca. 60 Jahre altem, bodengelagertem Skelettmateri

le mtSNPs detektiert. Angegebene Amplifikationsbedingungen konnten erfolgreich auf alle drei Systeme übertragen werden.

Das System 1 wurde aus der Literaturstelle [VJP04] entnommen und erfolgreich etabliert. Mit der Ausnahme von vernachlässigbaren unspezifischen Signalen, welche vermutlich durch den Messvorgang hervorgerufen wurden, ließen sich bei allen untersuchten Knochen- und Zahnproben kaum relevante Artefakte bei den mtSNP-Profilen erkennen. Obwohl System 2 und 3 durch deutliche unspezifische Signale gekennzeichnet waren, wurde eine Profilanalyse gleichermaßen wie bei System 1 möglich. Eine Individualität zwischen den Profilen analysierter Knochen- und Zahnproben wurde insbesondere durch System 2 und 3 angezeigt. Es konnten ausreichend hohe Signalstärken erzielt werden. Hervorzuheben ist die Sensitivität der Analyse-Primer aus System 2 und 3. Mit eingesetzten Konzentrationen im Bereich von $0,005 \mu M$ bis $0,03 \mu M$ weisen diese beiden Systeme eine höhere Sensitivität in der Amplifikation zugehöriger mitochondrialer Marker auf. Im Hinblick auf eine Analyse von degradiertem, Spurenmaterial lieferte der Einsatz von wenigen *fg* mtDNA eindeutig identifizierbare Peaks. Jedoch ist eine objektive Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Signalen bei Low-Level bzw. degradiertem mtDNA schwierig, da keine allgemein übertragbaren Leitlinien für die Interpretation ebensolcher Profile existieren. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll Kriterien, wie sie bei automatisierten STR-Analysen existieren, zu etablieren, welche die Auswertung solcher Profilverläufe erleichtern. Für das methodische Potential sollte in Fällen degradiertem mtDNA die Zyklusanzahl bei der Multiplexamplifikation beachtet werden, da in solchen Fällen nur mit relativ kurzen Fragmenten gearbeitet werden kann. Am Anfang der PCR entstehen zunächst verhältnismäßig längere Produkte als erwartet. Mit der Zunahme der Zykluszahl entstehen dann erwartete Amplifikatlängen. Allerdings steigt mit der Zunahme der Zykluszahl nicht nur das Risiko für das Auftreten von Artefakten, sondern auch die Amplifikation exogener mtDNA. Aus den Profilen wurde weiterhin ersichtlich, dass die Qualität vorliegender Template-mtDNA eine größere Rolle als die Anzahl eingesetzter mtDNA-Molekülzahlen spielt.

Deutlich wurde, dass die Zahnprofile in den überwiegenden Fällen starke Allelfluoreszenzintensitäten aufwiesen. Daraus kann geschlossen werden, dass die mtDNA durch die Beschaffenheit der Zähne wahrscheinlich besser vor Degradation geschützt ist. Aus der Literatur heraus wird oftmals der Zahnschmelz als geeignete Barriere gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen beschrieben. Zahlreiche Mitochondrien befinden sich vor allem in den Odontoblastenfortsätzen [MPYT99], die durch die umgebenden Zahnhartsubstanzen, wie der Zahnschmelz und das Wurzelzement, vor extremen Umwelteinflüssen geschützt werden. Durch diesen Schutz bleibt die mtDNA selbst dann noch gut erhalten, wenn andere Gewebe durch ihren hohen Zersetzungsgrad für eine DNA-Analyse nicht mehr geeignet sind [MPYT99].

Für die Unterscheidung von möglichen Mischspuren in der forensischen Molekulargenetik wurden die drei 8-plex-Systeme auf ihre Eignung geprüft. Neben Mischprofilen wurde ebenfalls versucht, Heteroplasmievarianten der mtDNA eindeutig zu detektieren. Wie schon erwähnt, befindet sich eine verlässliche Unterscheidung von Mischprofilen und einer Heteroplasmiedetektion durch mtSNP-Assays gegenwärtig noch in einer Grauzone. Für die Überprüfung dieses Sachverhaltes wurden gezielt Knochenproben gewählt, die in System 2 und 3 unterschiedliche Allelvarianten der mtSNPs aufwiesen. System 3 zeigte als einziges deutlich die erwartete Allelvarianten spezifischer Positionen an. Dies spricht jedoch keinesfalls gegen die Eignung der anderen beiden Systeme. Ursachen für ein Ausbleiben zusätzlicher allelspezifischer Signale bei System 1 und 2 könnten neben statistischen Einflussfaktoren, ebenso ungünstig gewählte Mengenverhältnisse eingesetzter mtDNA-Mengen oder Analyse-Primerkonzentrationen sein. Aus diesen Gründen sollten weitere Tests unter dem Einsatz verschiedener mtDNA-Mengenverhältnisse und weiteren Analyse-Primerkonzentrationen stattfinden. Gegenwärtige Ergebnisse einer Testung der Systeme auf Misch- und Heteroplasmievarianten konnten lediglich mit denen aus der Literaturstelle [VJP04] für System 1 verglichen werden. Für System 2 und 3 konnten hingegen keine Testergebnisse aus der zugehörigen Literaturstelle für diese Fragestellung entnommen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammengefasst kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Forschungsarbeit geschlossen werden, dass insbesondere für lang gelagertes und historisches Skelettmaterial eine Kombination aus effektiven Methoden von der Aufarbeitung bis hin zu einer umfangreichen Analyse mit Hilfe molekulargenetischer Markern in der Forensik erfolgversprechend ist. Die Etablierung von SNPs des mitochondrialen Genoms stellt eine Alternative für Untersuchungsmaterial dar, bei dem nur noch wenig bis gar keine oder stark degradierte Kern-DNA vorliegt. Im Hinblick auf aussagekräftige Profilverläufe ist es im allgemeinen zu empfehlen, verschiedene Regionen der Skelette mit Hilfe von mtSNPs zu analysieren, deren Vollständigkeit bereits im Voraus durch STR-Analysen geklärt wurde.

Ein weiterer entscheidender Vorteil liegt in der Analyse der Marker über die Minisequenzierung und einer anschließenden kapillarelektrophoretischen Detektion. Im Vergleich zu massenspektroskopischen Analysen sind verlässliche Ergebnisse schon innerhalb eines Tages zu erhalten. Um eine annähernd hohe Aussagekraft, wie sie mit STR-Analysen gegenwärtig erreicht wird, zu erhalten, sollte neben einer ausreichend hohen Anzahl, primär eine intelligente Zusammenstellung an mtSNPs getroffen werden. Vor diesem Hintergrund könnten die vorgestellten drei 8-plex-Systeme durch weitere, forensisch relevante mtSNPs erweitert werden.

Da es sich bei SNPs im Allgemeinen um einmalige Mutationsereignisse handelt und der Polymorphismus innerhalb einer Population somit nicht ausreichend hoch sein kann, sind sie auch in der molekularen Anthropologie zur Feststellung der Haplogruppenzugehörigkeit sehr gut einsetzbar. Im Hinblick auf die mtSNP-Zusammenstellung der Systeme 2 und 3 könnte mit Hilfe dieser Positionen eine Zugehörigkeit zu den neun europäischen Haplogruppen überprüft werden. Unter Einbeziehung des Informationsgehaltes aus System 1 könnten mit Erweiterung dieses Systems durch relevante Positionen zusätzliche HVI/HVII-Mitotypen unterteilt werden. Für eine forensische Relevanz sollten annotierte Austauschwahrscheinlichkeiten zusammenhängend betrachtet werden, sodass der Grad für polymorphe Positionen zueinander betrachtet wird. Ähnlich wie bei bioinformatischen Analysen könnten Konservierungen aus einer Art Alignment einzelner Positionen dargestellt werden, um die Individualität einzelner mtSNPs zu beurteilen. Hierfür ist es sicherlich günstig eine ausreichend hohe Anzahl an Proben zu analysieren, ähnlich wie in der Arbeit von Coble et al. [CJO⁺04]

Literaturverzeichnis

- [AB] APPLIED-BIOSYSTEMS: *Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler Y Human Male DNA Quantification Kit User's Manual*
- [ABB⁺81] ANDERSON, S. ; BANKIER, A.T. ; BARRELL, B.G. ; BRUIJN, M.H.L. de ; COULSON, A.R. ; DROUIN, J. ; EPERON, I.C. ; NIERLICH, D.P. ; ROE, B.A. ; SANGER, F. ; SCHREIER, P.H. ; SNITH, A.J.H. ; STADEN, R. ; YOUNG, I.G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. In: *Nature* 290 (1981)
- [ABBB81] ANDERSON, S. ; BANKIER, T.A. ; BARELL, B.G. ; BRUIJN, M.H.L. de: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. In: *Nature* 290 (1981)
- [AGA02] ANDREASSON, H. ; GYLLENSTEN, U. ; ALLEN, M.: Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. In: *Biotechniques* 33 (2002)
- [AKC⁺99] ANDREWS, R. M. ; KUBACKA, I. ; CHINNERY, P. F. ; LIGHTOWLERS, R. N. ; TURNBULL, D. M. ; HOWELL, N.: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. In: *Nat Genet* 23 (1999), Oct, Nr. 2, S. 147
- [ARM04] ACHILLI, A. ; RENGO, C. ; MAGRI, C.: The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. In: *Am J Hum Genet* 75 (2004), Nr. 5
- [AZK⁺97] AFONINA, I. ; ZIVARTS, M. ; KUTYAVIN, I. ; LUKHTANOV, E. ; GAMPER, H. ; MEYER, R.B.: Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. In: *Nucleic Acid Res* 25 (1997)
- [BBCM04] BUTLER, J.M. ; BUEL, E. ; CRIVELLENTI, F. ; MCCORD, B.R.: Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. In: *Electrophoresis* 25 (2004), Nr. 10-11
- [BCV07] BUTLER, J.M. ; COBLE, M.D. ; VALLONE, P.M.: STRs vs SNPs: Thoughts on the future of forensic DNA testing. In: *Forensic Science, Medicine and Pathology* 3 (2007)

- [BHHH99] BURGER, J. ; HUMMEL, S. ; HERMANN, B. ; HENKE, W.: DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. In: *Electrophoresis* 20 (1999), Nr. 8
- [BL98] BUTLER, J.M. ; LEVIN, B.C.: Forensic applications of mitochondrial DNA. In: *Trends Biotech* 16 (1998)
- [BLN⁺05] BRANDON, M.C. ; LOTT, M.T. ; NGUYEN, K.C. ; SPOLIM, S. ; NAVATHE, S.B. ; BALDI, P. ; WALLACE, D.C.: MITOMAP: a human mitochondrial genome database–2004 update. In: *Nucleic Acids Res* 33 (2005), Nr. Database issue
- [BMR00] BANDELT, H. J. ; MACAULAY, V. ; RICHARDS, M.: Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. In: *Mol Phylogenet Evol* 16 (2000), Nr. 1
- [BNP⁺07] BRANDSTÄTTER, A. ; NIEDERSTÄTTER, H. ; PAVLIC, M. ; GRUBWIESER, P. ; PARSON, W.: Generating population data for the EMPOP database - an overview of the mtDNA sequencing and data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example. In: *Forensic Sci Int* 166 (2007)
- [BPP03] BRANDSTÄTTER, A. ; PARSONS, T.J. ; PARSON, W.: Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. In: *Int J Legal Med* (2003)
- [BTRW95] BROWN, M. D. ; TORRONI, A. ; RECKORD, C. L. ; WALLACE, D. C.: Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. In: *Hum Mutat* 6 (1995), Nr. 4
- [Bur06] BURKHARD, M.: *Praxis Rechtsmedizin: Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*. Springer Berlin Heidelberg, 2006 (2)
- [But11] BUTLER, J.M.: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Bd. 1. 2011
- [Bv08] BUDOWLE, B. ; VAN DAAL, A.: Forensically relevant SNP classes. In: *Bio-techniques* 44 (2008)
- [CCTW⁺12] CAMPOS, P.F. ; CRAIG, O.E. ; TURNER-WALKER, G. ; PEACOCK, E. ; WIL- LERSLEV, E. ; GILBERT, M.T.P.: DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? In: *Ann Anat* 194 (2012), Jan

- [CJO⁺04] COBLE, M.D. ; JUST, R.S. ; O'CALLAGHAN, J.E. ; LETMANYI, I.H. ; PETERSON, C.T. ; IRWIN, J.A. ; PARSONS, T.J.: Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. In: *Int J Legal Med* 118 (2004)
- [CS03] CHEN, X. ; SULLIVAN, P.F.: Single nucleotide polymorphism genotyping: Biochemistry, protocol, cost and throughput. In: *Pharmacogenomics Journal* 3 (2003)
- [FNT05] FUKU, N. ; NISHIGAKI, Y. ; TANAKA, M.: [Human mitochondrial genome polymorphism database (mtSNP)]. In: *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 50 (2005)
- [GBHW03] GIBBS, R.A ; BELMONT, J.W ; HARDENBOL, P. ; WILLIS, T.D.: The international HapMap project. In: *Nature* (2003)
- [Gen] GENIAL ; GENIAL (Hrsg.): *All-tissue DNA-Kit. Handbuch für DNA-Extraktionen*. GENIAL
- [GPA⁺06] GRIGNANI, P. ; PELOSO, G. ; ACHILLI, A. ; TURCHI, C. ; TAGLIABRACCI, A. ; ALÙ, M. ; BEDUSCHI, G. ; RICCI, U. ; GIUNTI, L. ; ROBINO, C. ; GINO, S. ; PREVIDERÈ, C.: Subtyping mtDNA haplogroup H by SNaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. In: *Int J Legal Med* 120 (2006), Nr. 3
- [GR07] GANTEN, D. ; RUCKPAUL, K.: *Grundlagen der molekularen Medizin*. Springer Berlin Heidelberg, 2007 (3)
- [GRBH05] GREEN, R.L. ; ROINESTAD, I.C. ; BOLAND, C. ; HENNESSY, L.K.: Developmental Validation of the Quantifiler Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. In: *Forensic Sci* 50 (2005)
- [GWBG04] GILL, P. ; WERRETT, D.J. ; BUDOWLE, B. ; GUERRIERI, R.: An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases - joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). In: *Science and Justice* 44 (2004)
- [HBB⁺91] HOCHMEISTER, M.N. ; BUDOWLE, B. ; BORER, U.V. ; EGGMANN, U. ; COMEY, C. T. ; DIRNHOFER, R.: Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. In: *J Forensic Sci* 36 (1991), Nr. 6
- [HFR⁺95] HOLLAND, M.M. ; FISHER, D.L. ; ROBY, R.K. ; RUDERMAN, J ; BRYSON, C.

- ; WEEDN, V.W.: Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains. In: *Crime Lab Digest* 22 (1995)
- [HOMS⁺99] HOFF-OLSEN, P. ; MEVAG, B. ; STAALSTROM, E. ; HOVDE, B. ; EGELAND, T. ; OLAISEN, B.: Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. In: *Forensic Sci. Int.* (1999)
- [HP99] HOLLAND, M.M. ; PARSONS, T.J.: Mitochondrial DNA sequencing analysis-validation and use for forensic casework. In: *Forensic Sci Rev* (1999)
- [IKPG00] INGMAN, M. ; KAESSMANN, H. ; PÄÄBO, S. ; GYLLENSTEN, U.: Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. In: *Nature* 408 (2000), Nr. 6813
- [KNP05] KÖCHL, S. ; NIEDERSTÄTTER, H. ; PARSON, W.: DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol-Chloroform Method and Real-Time PCR Methods. In: *Molecular Biology, Forensic DNA Typing Protocols* 297 (2005)
- [Lip11] LIPPERT, H.: *Lehrbuch Anatomie*. Bd. 8. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2011
- [MEB⁺00] MACHUGH, D.E. ; EDWARDS, C.J. ; BAILEY, J.F. ; BANCROFT, D.R. ; BRADLEY, D.G.: The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth : a survey of current methodologies. In: *Ancient Biomolecules* 3 (2000)
- [MPYT99] MORNSTAD, H. ; PFEIFFER, H. ; YOON, C. ; TEIVENS, A.: Demonstration and semiquantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. In: *Int. J. Legal Med.* (1999), Nr. 112
- [Mul64] MULLER, H.J.: The relation of recombination to mutational advance. In: *Mutat Res* 1 (1964)
- [NG94] NEWTON, C.R. ; GRAHAM, A.: PCR. In: *Bios Scientific* (1994)
- [NKG⁺07] NIEDERSTÄTTER, H. ; KÖCHL, S. ; GRUBWIESER, P. ; PAVLIC, M. ; STEINLECHNER, M. ; PARSON, W.: A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA. In: *FSI Genetics* (2007)
- [Par09] PARSON, W.: Bedeutung der mtDNA-Analyse für forensische Fragestellungen. In: *CME.Springer* (2009)

- [PBR88] PERRY, WL 3rd ; BASS, W. M. ; RIGGSBY, W. S. ; SIROTKIN, K.: The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. In: *J Forensic Sci* 33 (1988), Nr. 1
- [PMS⁺97] PARSONS, T.J. ; MUNIEC, D.S. ; SULLIVAN, K. ; WOODYATT, N. ; GREINER, R. liston ; WILSON, M.R. ; BERRY, D.L. ; HOLLAND, K.A. ; WEEDN, V.W. ; GILL, P. ; HOLLAND, M.M.: A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. In: *Nat Genet* (1997)
- [Pro] PROMEGA ; PROMEGA CORPORATION (Hrsg.): *PowerPlex® S5 System. Technical Manual*. Promega Corporation
- [PSR⁺11] PEREIRA, L. ; SOARES, P. ; RADIVOJAC, P. ; LI, B. ; SAMUELS, D.C.: Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity. In: *Am J Hum Genet* 88 (2011), Nr. 4
- [RMSM09] ROLLINS, B. ; MARTIN, M.V. ; SEQUEIRA, P.A. ; MOON, E.A.: Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 3
- [RNBL96] RANKIN, D.R. ; NARVESON, S.D. ; BIRKBY, W.H. ; LAI, J.: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis on DNA from human compact bone. In: *J Forensic Sci* 41 (1996), Nr. 1
- [SBC05] SOBRINO, B. ; BRIO'N, M. ; CARRACEDO, A.: SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies. In: *Forensic Science International* 154 (2005)
- [SBMR07] SALAS, A. ; BANDELT, H-J. ; MACAULAY, V. ; RICHARDS, M.B.: Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. In: *Forensic Sci Int* 168 (2007), Nr. 1
- [Sch99] SCHEFFLER, I.E.: Mitochondria. In: *New York: Wiley-Liss* (1999)
- [Ser03] SERVIDEI, S.: Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. In: *Neuromuscul Disord* 13 (2003), S. 848–853
- [SLC01] SALAS, A. ; LAREU, M.V. ; CARRACEDO, A.: Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. In: *Int J Legal Med* (2001)
- [SPB⁺06] SANCHEZ, J.J. ; PHILLIPS, C. ; BØRSTING, C. ; BALOGH, K. ; BOGUS, M. ;

- FONDEVILA, M. ; HARRISON, C.D. ; MUSGRAVE-BROWN, E. ; SALAS, A. ; SYNDERCOMBE-COURT, D. ; SCHNEIDER, P.M. ; CARRACEDO, A. ; MORLING, N.: A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. In: *Electrophoresis* 27 (2006)
- [SV02] SCHWARTZ, M. ; VISSING, J.: Paternal inheritance of mitochondrial DNA. In: *New Engl J Med* 347 (2002)
- [SWK⁺01] SHERRY, S.T. ; WARD, M.H. ; KHOLODOV, M. ; BAKER, J. ; PHAN, L. ; SMIGIELSKI, E.M. ; SIROTKIN, K.: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. In: *Nucleic Acids Res* 1 (2001)
- [THF⁺96] TORRONI, A. ; HUOPONEN, K. ; FRANICALACCI, P. ; PETROZZI, M. ; MORELLI, L. ; SCOZZARI, R. ; OBINU, D. ; SAVONTAUS, M. L. ; WALLACE, D. C.: Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. In: *Genetics* 144 (1996), Dec, Nr. 4
- [TSOB05] TIMKEN, M.D ; SWANGO, K.L ; ORREGO, C. ; BUONCRISTIANI, M.R: A Duplex Real-Time qPCR Assay for the Quantification of Human Nuclear and Mitochondrial DNA in Forensic Samples: Implications for Quantifying DNA in Degraded Samples. In: *Forensic Sci* 50 (2005)
- [UM04] UTSUNO, H. ; MINAGUCHI, K.: Influence of template DNA degradation on the genotyping of SNPs and STR polymorphisms from forensic materials by PCR. In: *Bull Tokyo Dent Coll* 45 (2004), Nr. 1
- [VJP04] VALLONE, P.M. ; JUST, R.S. ; PARSONS, T.J.: A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. In: *Int J Legal Med* (2004)
- [vK09] VAN OVEN, M. ; KAYSER, M.: Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. In: *Hum Mutat* 30 (2009), Nr. 2
- [WC05] WILLERSLEV, E. ; COOPER, A.: Ancient DNA. In: *Proc Biol Sci* 272 (2005), Jan, Nr. 1558

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, 22. August 2012